

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO RODRIGUES CABRERA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E
BIOCHIP NA TRIAGEM TOXICOLÓGICA FORENSE**

CURITIBA

2013

EDUARDO RODRIGUES CABRERA

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E BIOCHIP NA
TRIAGEM TOXICOLÓGICA FORENSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Linha de Pesquisa em Toxicologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Almeriane Maria
Weffort Santos

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO


EDUARDO RODRIGUES CABRERA

Título: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS E BIOCHIP NA TRIAGEM TOXICOLÓGICA FORENSE

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Profa. Dra. Almeriane Maria Weffort Santos
Orientadora


Prof. Dr. Ricardo Wagner
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Marianna Maia Taulois do Rosário
Polícia Científica do Paraná


Prof. Dr. Marco André Cardoso
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe

Curitiba, 5 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Jesus pela oportunidade da encarnação e do desenvolvimento de meu ser;

À Profa. Dra. Almeriane M. W. Santos pela orientação;

Ao Prof. Dr. Ricardo Wagner pela atenção, ajuda, orientação e amizade de valor inestimável;

Às Profas. Marilu Lopes e Maria Madalena Gabriel pelos conselhos e apoio;

À Direção do Instituto Médico-Legal do Paraná pela possibilidade de execução do projeto;

À Perita Priscylla M. K. Camelo pelo suporte a mim dispensado;

Aos Peritos Oficiais do Instituto Médico-Legal do Paraná pela ajuda, paciência, conselhos e pela amizade que supera os limites profissionais;

Aos demais Peritos da Polícia Científica do Paraná pelo incentivo e motivação;

Aos amigos e colaboradores do laboratório do Prof. Dr. Roberto Pontarolo (CEB), que tanto contribuíram para a finalização deste estudo, em especial o Doutorando João Gasparetto.

Aos meus amigos e familiares que tanto me auxiliaram nos momentos mais difíceis;

Ao meu amor, que tanto abriu mão de si a meu favor.

RESUMO

A atividade mais conhecida da toxicologia forense é a detecção e quantificação de substâncias químicas em matrizes biológicas *postmortem*. Para guiar os procedimentos de análise e facilitar a elucidação dos casos periciados faz-se necessário o uso de técnicas de análise mais gerais, conhecidas como técnicas de triagem. Com o objetivo de estudar diferentes métodos de triagem toxicológica, o presente trabalho teve o objetivo de selecionar, avaliar e aplicar técnicas de triagem dentro de uma rotina de análise toxicológica sistemática com escopo forense. Foram selecionadas duas técnicas, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por arranjo de diodos e imunoensaio com quimioluminescência por Biochip, para as quais foram submetidas amostras de sangue total e urina coletadas de cadáveres necropsiados. Ambas as técnicas apresentaram boa sensibilidade para as substâncias elencadas como de interesse, assim como tiveram influência do tipo de matriz biológica analisada. Apesar de bons níveis de concordância, as técnicas estudadas apresentaram resultados divergentes importantes e que demandariam intervenção. Cada técnica apresentou vantagens e desvantagens particulares que devem ser avaliadas caso a caso, de acordo com a demanda e a necessidade do laboratório.

Palavras-chave: Triagem toxicológica. CLAE-DAD. Biochip. Toxicologia Forense.

ABSTRACT

The best known activity of the Forensic Toxicology is the detection and quantification of chemicals in postmortem biological matrices. To guide the procedures and facilitate the elucidation of juridical cases it is necessary to use more general techniques of analysis, known as screening techniques. With the aim of studying different toxicological techniques of screening, the present study offered to select, evaluate and apply screening techniques within a routine of systematic toxicological analysis in a forensic ambient. It was selected two techniques, high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and chemiluminescence immunoassay by using Biochip. They were subjected to real samples of whole blood and urine collected from autopsied corpses. Both techniques showed good sensitivity for substances listed as of interest, and were influenced by the type of biological matrix analyzed. Despite good agreement, the techniques studied showed important divergent results that require intervention. Each technique has particular advantages and disadvantages that should be evaluated case by case, according to the demand and need of the laboratory.

Keywords: Toxicological Screening. HPLC-DAD. Biochip. Forensic Toxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DA METANFETAMINA – URINA	40
FIGURA 2	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BARBITÚRICOS – URINA	41
FIGURA 3	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS I – URINA	42
FIGURA 4	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS II – URINA	43
FIGURA 5	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE METADONA – URINA	44
FIGURA 6	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE OPIÁCEOS – URINA	45
FIGURA 7	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE FENCICLIDINA – URINA	46
FIGURA 8	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BENZOILECGONINA – URINA ...	47
FIGURA 9	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CANABINÓIDES – URINA	48
FIGURA 10	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ANFETAMINA – URINA	49
FIGURA 11	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CREATININA – URINA	50
FIGURA 12	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DA METANFETAMINA – SANGUE ...	52
FIGURA 13	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BARBITÚRICOS – SANGUE	53
FIGURA 14	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS I – SANGUE	54
FIGURA 15	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BENZODIAZEPÍNICOS II – SANGUE	55
FIGURA 16	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE METADONA – SANGUE	56
FIGURA 17	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE OPIÁCEOS – SANGUE	57
FIGURA 18	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE FENCICLIDINA – SANGUE	58
FIGURA 19	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE BENZOILECGONINA – SANGUE	59
FIGURA 20	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE CANABINÓIDES – SANGUE	60
FIGURA 21	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ANFETAMINA – SANGUE	61
FIGURA 22	– EXEMPLO DE ANÁLISE REALIZADA POR BIOCHIP	65
FIGURA 23	– CROMATOGRAMA DE AMOSTRA OBTIDO POR CLAE-DAD ...	79
FIGURA 24	– ESPECTROS DAD DO MIDAZOLAM E CAFEÍNA DETECTADOS POR CLAE-DAD	79
FIGURA 25	– CROMATOGRAMA DE AMOSTRA OBTIDO POR CLAE-EM/EM	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– AMOSTRAS COLETADAS	35
TABELA 2	– MATRIZ PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS	36
TABELA 3	– CURVA DE METANFETAMINA – URINA	40
TABELA 4	– CURVA DE BARBITÚRICOS – URINA	41
TABELA 5	– CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS I – URINA	42
TABELA 6	– CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS II – URINA	43
TABELA 7	– CURVA DE METADONA – URINA	44
TABELA 8	– CURVA DE OPIÁCEOS – URINA	45
TABELA 9	– CURVA DE FENCICLIDINA – URINA	46
TABELA 10	– CURVA DE BENZOILECGONINA – URINA	47
TABELA 11	– CURVA DE CANABINÓIDES – URINA	48
TABELA 12	– CURVA DE ANFETAMINA – URINA	49
TABELA 13	– CURVA DE CREATININA – URINA	50
TABELA 14	– RESUMO DA AVALIAÇÃO PARA BIOCHIP – URINA	51
TABELA 15	– CURVA DE METANFETAMINA – SANGUE	52
TABELA 16	– CURVA DE BARBITÚRICOS – SANGUE	53
TABELA 17	– CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS I – SANGUE	54
TABELA 18	– CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS II – SANGUE	55
TABELA 19	– CURVA DE METADONA – SANGUE	56
TABELA 20	– CURVA DE OPIÁCEOS – SANGUE	57
TABELA 21	– CURVA DE FENCICLIDINA – SANGUE	58
TABELA 22	– CURVA DE BENZOILECGONINA – SANGUE	59
TABELA 23	– CURVA DE CANABINÓIDES – SANGUE	60
TABELA 24	– CURVA DE ANFETAMINA – SANGUE	61
TABELA 25	– RESUMO DA AVALIAÇÃO PARA BIOCHIP – SANGUE	62
TABELA 26	– RESULTADOS EM RLU PARA BIOCHIP NA URINA.....	65
TABELA 27	– RESULTADOS EM RLU PARA BIOCHIP NO SANGUE	67
TABELA 28	– RESULTADOS CONVERTIDOS PARA CONCENTRAÇÃO NA URINA.....	70
TABELA 29	– RESULTADOS CONVERTIDOS PARA CONCENTRAÇÃO NO SANGUE	72
TABELA 30	– RESULTADO FINAL PARA BIOCHIP NA URINA	74

TABELA 31 – RESULTADO FINAL PARA BIOCHIP NO SANGUE	76
TABELA 32 – RESULTADO CROMATOGRÁFICO DAS URINAS.....	80
TABELA 33 – RESULTADO CROMATOGRÁFICO DOS SANGUES	81
TABELA 34 – RESUMO DAS URINAS POR BIOCHIP	84
TABELA 35 – RESUMO DAS URINAS POR CLAE-DAD.....	85
TABELA 36 – COMPARATIVO PARA URINA.....	86
TABELA 37 – RESUMO DOS SANGUES POR BIOCHIP.....	87
TABELA 38 – RESUMO DOS SANGUES POR CLAE-DAD	88
TABELA 39 – COMPARATIVO PARA SANGUE.....	89
TABELA 40 – COMPARATIVO ENTRE TRIAGENS E CONFIRMATÓRIO NO SANGUE	93
TABELA 41 – COMPARATIVO ENTRE TRIAGENS E CONFIRMATÓRIO NA URINA.....	94
TABELA 42 – ÍNDICES DE FALSO POSITIVO E NEGATIVO NO SANGUE.....	95
TABELA 43 – ÍNDICES DE FALSO POSITIVO E NEGATIVO NA URINA.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 GERAL	11
2.2 ESPECÍFICOS	11
3 APORTE TEÓRICO	12
3.1 HISTÓRICO DA TOXICOLOGIA	12
3.2 ÁREAS DA TOXICOLOGIA	17
3.3 TOXICOLOGIA ANALÍTICA E FORENSE	19
3.4 INVESTIGAÇÃO E ANÁLISE TOXICOLÓGICA	20
3.4.1 Histórico e Amostragem	21
3.4.2 Análise Toxicológica	22
3.4.2.1 Métodos de triagem	23
3.4.2.2 Métodos confirmatórios	25
3.4.2.3 Estado da arte atual	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 COLETA DE AMOSTRAS	28
4.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE TRIAGEM	29
4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos	29
4.2.2 Biochip	31
4.3 TÉCNICA ANALÍTICA CONFIRMATÓRIA	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 MATRIZES BIOLÓGICAS	34
5.2 AVALIAÇÃO ANALÍTICA	37
5.2.1 Biochip Array	37
5.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	62
5.2.3 Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (CLAE-EM/EM)	63
5.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA DAS AMOSTRAS REAIS	63
5.3.1 Análise Através de Biochip	63

5.3.2 Análise Através de CLAE-DAD	77
5.4 ANÁLISE COMPARATIVA	82
5.4.1 Matriz Urina	82
5.4.2 Matriz Sangue Total	86
5.4.3 Sangue <i>Versus</i> Urina	90
5.4.4 Análise Confirmatória por CLAE-EM/EM	90
5.4.5 Vantagens e Desvantagens	97
6 RELEVÂNCIA	100
6.1 RELEVÂNCIA CIENTÍFICA	100
6.2 RELEVÂNCIA SOCIAL	101
7 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia forense é a área da toxicologia que se ocupa com a ciência toxicológica aplicada a casos de foro legal. A abordagem mais conhecida dessa área é a detecção e quantificação de substâncias químicas em matrizes biológicas *postmortem*.

A existência da toxicologia forense está ligada à toxicologia analítica ou, mais especificamente, a procedimentos da química analítica para a correta determinação da presença ou ausência de agentes tóxicos nos diversos fluidos e tecidos obtidos como amostra.

A escolha do método analítico adequado depende das propriedades físico-químicas das substâncias de interesse. É possível chegar a um resultado analítico satisfatório quando o analista sabe qual é o analito a ser detectado.

Porém, em toxicologia forense, é comum o toxicologista não saber exatamente qual substância procurar pelo fato do histórico do caso não ser esclarecedor e nem a necropsia fornecer dados conclusivos.

Para guiar os procedimentos de análise e facilitar a elucidação dos casos periciados faz-se necessário lançar mão de técnicas de análise mais gerais, sensíveis, porém menos específicas. Essas técnicas são conhecidas como técnicas de triagem.

Com o objetivo de estudar duas técnicas de triagem toxicológica utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector por Arranjo de Diodos e Biochip, o presente trabalho propõe-se a empregar, avaliar e aplicar técnicas de triagem para fins toxicológicos, dentro de uma rotina de análise toxicológica sistemática com escopo forense.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar duas técnicas de triagem toxicológica cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos e biochip, dentro de uma rotina sistematizada com escopo forense.

2.2 Específicos

- Empregar técnicas de triagem para fins toxicológicos;
- Avaliar, qualitativamente, as duas técnicas de triagem toxicológica;
- Aplicar amostras forenses reais nas técnicas selecionadas;
- Comparar as triagens entre si;
- Comparar os métodos de triagem com um método confirmatório;
- Realizar estudo geral entre vantagens, desvantagens, custo e eficiência das técnicas;

3 APORTE TEÓRICO

3.1 HISTÓRICO DA TOXICOLOGIA

Muito da história da toxicologia antiga perdeu-se no tempo e o que sobreviveu ao avançar das eras está registrado nos primeiros manuscritos sobre medicina. Historicamente, a toxicologia formou a base da terapêutica e da medicina experimental. Ela acompanha a história da civilização, pois desde épocas remotas o homem possuía conhecimentos sobre os venenos de animais e de plantas tóxicas (GALLO, 2001; HODGSON, 2004; OGA; SIQUEIRA, 2008).

A toxicologia data dos primeiros seres humanos que usavam esses venenos de animais e plantas para caçar e guerrear. É certo que humanos pré-históricos já diferenciavam plantas tóxicas de plantas não tóxicas. O mesmo aplicava-se a cobras e outros animais (GALLO, 2001).

Assim, a toxicologia é uma das ciências práticas mais antigas. Um dos documentos mais antigos, o papiro de Ebers (1500 a.C.), continha informações acerca de vários venenos incluindo acônito, ópio e metais como chumbo, cobre e antimônio. Estima-se que este documento registre uma lista de cerca de 800 ingredientes ativos (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Na literatura da Grécia antiga havia diversas referências a venenos e seus usos. O poeta grego Nicander tratou de temas da toxicologia, como toxinas de animais e antídotos a toxinas de animais e vegetais, em dois trabalhos poéticos. Hipócrates e Theophrastus (460 a.C. e 286 a.C., respectivamente) contribuíram muito para a identificação de novos agentes (HODGSON, 2004).

Dioscorides, um médico grego da corte romana, do tempo de Nero (40 - 90 d.C.), fez a primeira tentativa de classificação dos venenos, com descrições e desenhos. Classificou-os em venenos de plantas, animais e minerais, uma classificação conveniente até os tempos atuais. Entre as substâncias do reino mineral citavam-se o arsênio, o chumbo, o cobre e o antimônio. O ópio, a cicuta, o acônito e os digitálicos estavam entre os agentes tóxicos do reino vegetal, enquanto os venenos de víboras, sapos e salamandras representavam os agentes do reino animal. Dioscorides ainda recomendava o uso de eméticos em casos de envenenamentos e ventosas nas picadas de cobras (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Na antiguidade, envenenamentos foram muito utilizados com fins políticos. O primeiro envenenamento oficial conhecido é a execução de Sócrates (470 – 399 a.C.) condenado a ingerir cicuta. Mas não só para execução, como para o suicídio foram utilizados os saberes toxicológicos; Demóstenes (385 – 322 a.C.), por exemplo, tomou veneno que carregava em sua caneta (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Nessa época, Mitrídates pode ter sido o primeiro a realizar experiências na área toxicológica. O *mitridaticum*, resultado de algumas de suas experiências, composto por uma mistura de gordura de víbora e enxofre, era utilizado como tônico e antídoto. O raciocínio que Mitrídates seguia envolvia o fato da gordura da víbora ser tida como dotada de ação protetora uma vez que a serpente era resistente ao seu próprio veneno. O tônico resistiu ao tempo e foi utilizado até a Idade Média (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Em Roma, casos de envenenamentos tornaram-se epidêmicos. Tal epidemia durou até Sula promulgar a *Lex Cornelia* (82 a.C.). Essa parece ter sido a primeira lei contra envenenamentos (GALLO, 2001).

Ao longo do obscurantismo da Idade Média os envenenamentos eram tidos como risco normal da vida. Nesse momento histórico, alguns conhecimentos científicos em toxicologia foram gerados pelos árabes (OGA; SIQUEIRA, 2008).

A medicina árabe desenvolveu métodos químicos para a preparação de extratos medicamentosos aplicados aos venenos. Os estudos de Maimonides compuseram um tratado acerca dos antídotos para venenos de insetos, cobras e cachorros loucos. Assim como Hipócrates, o médico árabe esboçou conceitos de biodisponibilidade, inclusive recomendando leite, manteiga e cremes gordurosos para retardar a absorção intestinal de substâncias (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Durante o Renascimento, os italianos elevaram a arte de envenenar ao seu auge. A figura do envenenador passou a integrar o cenário político da época e os registros demonstram testemunhos acerca do uso criminal dos venenos (GALLO, 2001).

Uma personagem conhecida dessa época era Madame Tofana, que preparava cosméticos a base de arsênio (Água Tofana). Também nesse período, Catarina de Medici exportou seus conhecimentos da Itália para a França. À guisa de distribuir proventos aos pobres e doentes, Catarina testou agentes tóxicos tomando notas

sobre suas potências, início de ação, especificidade, órgãos atingidos e sinais e sintomas manifestados (GALLO, 2001).

A culminância dessa prática na França deu-se com a comercialização deste serviço por Catarina Deshayes. Seu empreendimento foi encerrado por sua execução, pois foi acusada de envenenar, dentre outros, cerca de duas mil crianças (GALLO, 2001).

Luís XIV estabeleceu então uma comissão judicial especial para punir envenenadores, a *Chambre Ardente*, que teve um expressivo papel na diminuição do uso de veneno com finalidade criminal (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Já próximo ao Iluminismo, surgiu uma figura de grande importância na medicina, assim como na história da ciência: Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus Von Hohenheim-Paracelsus (GALLO, 2001).

No tempo entre Aristóteles e Paracelsus não ocorreram mudanças substanciais nas ciências biomédicas. Paracelsus desenvolveu estudos e idéias revolucionárias, na época, envolvendo a farmacologia, a toxicologia e a terapêutica. Vários princípios por ele enunciados permanecem ainda válidos, principalmente seu postulado mais conhecido: *“todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose correta diferencia o veneno do remédio”* (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Paracelsus determinou que substâncias químicas específicas eram responsáveis pela toxicidade de um veneno animal ou vegetal. Também documentou que a resposta do corpo em relação à substância depende da dose administrada. Seus estudos revelaram que pequenas doses de uma substância podem ser inofensivas ou benéficas enquanto altas doses podem ser tóxicas. Essa relação estabelecida por ele, hoje é conhecida como relação dose-resposta (LANGMAN; KAPUR, 2006).

Essa perspectiva iniciada por Paracelsus e herdada pelos tempos modernos tem como princípios corolários que: a experimentação é essencial no exame das respostas a uma substância química; há de se fazer a distinção entre as propriedades tóxicas e as terapêuticas dessas substâncias; essas propriedades são, em alguns casos, indistinguíveis a não ser pela dose administrada; é possível precisar uma dose específica de um agente químico e seus efeitos tóxicos e terapêuticos. Através desses postulados foi possível a introdução do conceito de índice terapêutico e a articulação da relação dose-resposta (GALLO, 2001).

É também nesse período que se iniciaram as preocupações com a saúde dos trabalhadores. O trabalho de Paracelsus, publicado em 1567, foi um estudo bastante completo realizado na área ocupacional, citando não apenas a sintomatologia e o tratamento, mas também discorrendo sobre a prevenção de doenças associadas ao trabalho. Estudos nesta área foram posteriormente desenvolvidos por Bernardino Ramazzini que publicou uma obra, no século XVIII, que marca o início do desenvolvimento da medicina e da toxicologia ocupacional (GALLO, 2001; HODGSON, 2004; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Mais tarde, ainda no século XVIII, algumas técnicas analíticas foram introduzidas na toxicologia por Joseph Jacob Plenck para identificar agentes tóxicos em tecidos, na tentativa de comprovar as causas de envenenamentos. Da aplicação do método analítico em toxicologia surge a toxicologia forense (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Mathieu Joseph Bonaventure Orfila, trabalhando na Universidade de Paris, preparou uma comparação sistemática entre a química e as propriedades biológicas das substâncias químicas de sua época. Administrava doses conhecidas de substâncias químicas em animais e observava os efeitos produzidos, examinando em seguida os órgãos e efetuando análise dos agentes em diferentes tecidos e fluidos. A observação dos efeitos bem como da concentração da substância alcançada nos tecidos permitiu-lhe concluir que os agentes tóxicos são absorvidos pelo trato gastrintestinal. Suas investigações permitiram ainda relacionar certos sintomas com as lesões específicas causadas em tecidos (LANGMAN; KAPUR, 2006; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Orfila foi o primeiro toxicologista a usar material de autópsia e análise química como prova legal de envenenamento. Ele afirmou que as investigações relativas à morte eram muito importantes para serem deixadas a cargo de pessoas não treinadas para tal. Enfatizou que a toxicologia deveria ser uma ciência autônoma e que as análises químicas deveriam ser parte de sua fundação. Seu trabalho realça a importância da combinação da toxicologia forense, clínica e a química analítica (LANGMAN; KAPUR, 2006; OGA; SIQUEIRA, 2008).

Durante o século XIX, muitos cientistas contribuíram de forma extraordinária ao progresso da toxicologia mecanística com seus estudos por métodos científicos e sistemáticos (LANGMAN; KAPUR, 2006).

Este século também foi marcado pelas revoluções industrial e política. Nessa época foram sintetizados solventes industriais e gases tóxicos para a guerra. A avaliação toxicológica desses produtos embasou as futuras legislações acerca da segurança dos trabalhadores e esboçou as experimentações toxicológicas que seriam utilizadas na modernidade (GALLO, 2001).

O fisiologista Magendie demonstrou o funcionamento de nervos espinhais, estudou o fluxo sanguíneo e os fenômenos de deglutição. Descreveu os mecanismos de ação da estricnina e da emetina, incluindo a dinâmica de movimentos através de membranas (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Claude Bernard, discípulo de Magendie, estudou a fisiologia normal e patológica. Sua grande contribuição foi a introdução do conceito de toxicidade de substâncias em órgãos alvo. Desenvolvendo estudos sobre o curare, permitiu o esclarecimento de seu mecanismo de ação sobre a placa terminal de músculos estriados (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Já Ehrlich teve destaque no cenário científico pela sua dedicação ao estudo dos mecanismos de ação de agentes tóxicos (toxicodinâmica) e de fármacos (farmacodinâmica). Propôs a teoria de que as substâncias ativas teriam no organismo pontos específicos de ataque onde ocorreriam as interações químico-biológicas. Posteriormente, identificou vários receptores e se tornou o fundador da teoria de receptores (OGA; SIQUEIRA, 2008).

No século XX, o mundo testemunhou uma explosão na ciência que deu início a era moderna da medicina, biologia e física. Milhares de novos compostos foram sintetizados para diversos fins farmacêuticos, alimentares e agrícolas. Nesse período, o uso de medicamentos “de patente” tornou-se prevalente e vários incidentes de intoxicação ocorreram (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

O crescimento exponencial da toxicologia remonta à Segunda Guerra Mundial, onde houve expressivo aumento na produção de drogas, pesticidas, munições, fibras sintéticas e produtos químicos industriais (GALLO, 2001).

Ensaio de toxicidade iniciaram-se neste século e na década de 30 foi publicado um dos primeiros jornais científicos de toxicologia experimental. Em 1937, houve morte de centenas de pacientes tratados com sulfonamida. O solvente dietilenoglicol utilizado na preparação do elixir de sulfanilamida foi o causador das intoxicações. No fim da década de 1950, várias crianças foram vítimas de focomelia devido à utilização da talidomida pelas mulheres grávidas. A talidomida é

teratogênica aos fetos, principalmente no primeiro trimestre de gestação (GALLO, 2001; OGA; SIQUEIRA, 2008).

No período pós-guerra, a toxicologia envolveu-se com pesquisas na área da radiação, mutagenicidade, pesticidas organofosforados e segurança alimentar. Tais pesquisas embasaram para a posteridade os atos regulatórios na área alimentícia, farmacêutica, cosmética, dentre outras (GALLO, 2001).

Legislações, jornais científicos e novas sociedades de toxicologistas aumentaram exponencialmente nas décadas de 70 e 80. Desde então, os avanços se multiplicaram e aumentaram o conhecimento científico acerca da química dos agentes tóxicos, da terapêutica em intoxicações, das análises químicas e biológicas dos toxicantes e suas toxicidades, dos modos de ação, dos processos de detoxificação, bem como os eventos moleculares envolvidos em toxicologia (GALLO, 2001; HODGSON, 2004).

Hoje o foco da toxicologia é voltado à avaliação da segurança e do risco na utilização de substâncias químicas. Visa também o controle regulatório de exposição às substâncias químicas no alimento, no meio ambiente, nos locais de trabalho e na sociedade. Tem atualmente um foco na prevenção (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Os avanços tecnológicos atuais também integram essa toxicologia contemporânea. Métodos sofisticados de análise têm sido absorvidos e utilizados para a detecção e quantificação desses agentes tóxicos (OGA; SIQUEIRA, 2008).

3.2 ÁREAS DA TOXICOLOGIA

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que empresta conhecimentos das ciências básicas. Necessita de conhecimentos, métodos e conceitos filosóficos de algumas ciências para sua atuação, como a química, bioquímica, patologia, fisiologia, epidemiologia, imunologia, ecologia, biofísica e, mais recentemente, da biologia molecular (LANGMAN, 2006; OGA; SIQUEIRA, 2008).

É uma ciência eclética e contribui significativamente para o desenvolvimento de outras ciências e atividades humanas. A sua contribuição hoje é bastante notada para ciências como a medicina forense, a toxicologia clínica, a farmácia, a farmacologia, saúde pública e higiene industrial. Também contribui para a medicina veterinária e alguns aspectos importantes da agricultura, como no desenvolvimento e uso seguro de praguicidas (OGA; SIQUEIRA, 2008).

De acordo com Oga e Siqueira (2008), na toxicologia distinguem-se cinco áreas de atuação classificadas de acordo com a natureza do agente ou de acordo com a maneira como este agente atinge o sistema biológico:

- A toxicologia ambiental é a área da toxicologia que estuda os efeitos nocivos causados pela interação de agentes químicos disponíveis no ambiente com os humanos expostos nesse ambiente;
- A toxicologia ocupacional dedica-se ao estudo dos efeitos nocivos produzidos pela interação dos agentes químicos presentes no ambiente de trabalho com os indivíduos a eles expostos;
- A toxicologia de alimentos estuda os efeitos deletérios provocados por substâncias químicas presentes em alimentos;
- A toxicologia de medicamentos e cosméticos é a área em que se estudam os efeitos nocivos produzidos pela interação de medicamentos ou cosméticos com o organismo, decorrentes de uso inadequado ou da suscetibilidade individual;
- A toxicologia social estuda os efeitos decorrentes do uso não médico e não terapêutico de drogas ou fármacos, causando prejuízo ao usuário e à sociedade.

Já segundo Eaton e Klaassen (2001), os grandes campos de atuação da toxicologia seriam resumidos em três áreas:

- Toxicologia mecanística, onde a preocupação é identificar e entender os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares por quais as substâncias químicas exercem seu efeito tóxico em organismos vivos;
- Toxicologia descritiva, cujo objetivo é a execução de testes de toxicidade que fornecem dados para avaliações de segurança e assuntos regulatórios;
- Toxicologia regulatória, que tem a responsabilidade decisória baseada nos dados obtidos das áreas mecanística e descritiva.

O campo de atuação da toxicologia expandiu enormemente nas últimas décadas. Em cada uma dessas áreas citadas vários aspectos da toxicologia podem ser abordados, como o forense ou legal, regulatório, clínico, comportamental,

nutricional, analítico, veterinário e industrial (EATON; KLAASSEN, 2001; HODGSON, 2004; LANGMAN, 2006; OGA; SIQUEIRA, 2008;).

Diante da complexidade e à amplitude do campo da toxicologia, faz-se necessário um trabalho conjunto de profissionais com diferentes formações para a resolução de problemas envolvendo substâncias tóxicas (OGA; SIQUEIRA, 2008).

3.3 TOXICOLOGIA ANALÍTICA E FORENSE

Não é possível considerar a toxicologia forense sem discutir a toxicologia analítica, que por sua vez tem suas raízes na própria forense. Portanto, é mais racional apresentar essas duas áreas em conjunto (POKLIS, 2001).

A toxicologia analítica envolve a aplicação das ferramentas da química analítica para fazer estimativas qualitativas e quantitativas de substâncias que podem exercer efeitos deletérios em um organismo. É considerada uma mistura entre a química analítica e a toxicologia fundamental (POKLIS, 2001; BRANCH, 2004).

A toxicologia forense envolve o uso da toxicologia geral e da analítica para propósitos legais. Suas atividades incluem:

- Detecção de drogas de abuso em materiais biológicos e não biológicos;
- Gerar dados úteis para a toxicologia regulatória;
- Avaliar danos à saúde ocupacional;
- Identificar os agentes causadores de morte ou danos a humanos e animais;
- Dar testemunhos e consultoria relacionada aos toxicantes e intoxicações.

Apesar de possuir definição abrangente e incluir uma gama de aplicações, a abordagem mais comum da toxicologia forense é a de identificar qualquer substância química que possa ter sido a causa de um óbito ou de injúria a seres humanos ou propriedades. É útil na investigação de mortes que possam ter alguma relação com uma droga ou agente tóxico, como os suicídios executados através de auto-envenenamentos e os homicídios perpetrados com emprego de substância tóxica, por exemplo (POKLIS, 2001; BRANCH, 2004).

A toxicologia forense é também útil quando o processo de decomposição cadavérica atinge estado tão elevado que torna difícil obter informações acerca do óbito através de exame necroscópico rotineiro (FLANAGAN et al., 2007).

Além dos incidentes fatais, os não fatais também têm espaço na toxicologia forense e seus principais representantes são as análises efetuadas em motoristas flagrados dirigindo sob efeito de etanol ou outros psicotrópicos, em dopagem esportiva e no abuso sexual facilitado por drogas (FLANAGAN et al., 2007).

Incidentes criminais devem ser apurados e julgados pelo sistema judiciário. Evidências circunstanciais ou indiretas são trazidas à tona em um processo criminal tentando-se estabelecer o elo entre causa e efeito. No entanto, não há substituto a uma identificação inequívoca de uma substância em matrizes provenientes da vítima, em uma concentração suficiente para justificar o dano e acompanhada de um grau razoável de certeza científica. Por essa razão a toxicologia forense e a toxicologia analítica estabeleceram uma parceria duradoura (FAVRETTO; PASCALI; TAGLIARO, 2013).

A investigação completa da causa ou das causas de óbito é uma responsabilidade civil. Estabelecer a causa do óbito é tarefa do médico legista ou do patologista, mas o sucesso de uma conclusão mais correta, com frequência, depende dos esforços combinados entre a patologia e a toxicologia (POKLIS, 2001; FAVRETTO; PASCALI; TAGLIARO, 2013).

A causa da morte em casos de envenenamentos não pode ser provada sem uma análise toxicológica que a defina objetivamente. Além disso, um toxicologista pode fornecer evidências valiosas acerca das circunstâncias do óbito. Tais casos, normalmente, envolvem a demonstração de etanol em vítimas de acidentes automobilísticos ou ocupacionais, ou a presença de monóxido de carbono em vítimas fatais de incêndios, por exemplo (FROST et al., 2012).

3.4 Investigação e Análise Toxicológica

Dentre as ações de um toxicologista forense nas investigações pós-morte, incluem-se as análises toxicológicas qualitativas e quantitativas de drogas e toxicantes em matrizes biológicas coletadas em necropsias e a interpretação do achado analítico considerando os efeitos fisiológicos e comportamentais das substâncias detectadas (POKLIS, 2001; FROST et al., 2012).

Geralmente a substância química a ser analisada é um xenobiótico que pode ter sido alterado (biotransformado) por ação metabólica do organismo, ou seja, sem sua identidade química inicial. Somado a isso, o analito apresenta-se em uma matriz formada por fluidos ou tecidos corpóreos. Tanto a identidade do analito quanto a da matriz são problemas analíticos que devem ser resolvidos pelo toxicologista em uma investigação toxicológica (POKLIS, 2001).

Muitos agentes tóxicos não produzem lesão característica em um organismo. Sua presença em um organismo pode ser demonstrada apenas por métodos químicos de isolamento e identificação desses agentes (SKOOP, 2004).

Se as investigações toxicológicas são evitadas, mortes resultantes de envenenamento podem ser atribuídas a outras causas diferentes, ou a intoxicação pode ser atribuída como causa sem a devida comprovação (SKOOP, 2004).

Tais diagnósticos errôneos podem ter consequências legais e sociais. Em uma análise toxicológica que tem um resultado negativo é também importante avaliar a causa do óbito. A ausência de uma substância que deveria estar presente nas matrizes coletadas, como um medicamento prescrito para a vítima e que era essencial à sua vida, contribui para o estabelecimento lógico do evento fatal (POKLIS, 2001).

Além disso, os resultados dos testes toxicológicos *postmortem* geram dados epidemiológicos e estatísticos acerca de epidemias de abuso de drogas, novas substâncias psicoativas no mercado, associação entre mortes violentas e abuso de substâncias ilícitas, dentre outros (POKLIS, 2001).

Uma investigação toxicológica pode ser dividida em três etapas: obtenção do histórico do caso e amostragem, a análise toxicológica propriamente dita e a interpretação dos achados.

3.4.1 Histórico e Amostragem

O primeiro passo em uma investigação toxicológica pós-morte é a revisão do histórico do caso e a análise dos achados necroscópicos (LEVINE; SMITH; FROEDE, 1990).

Essa coleta de informações e descrição de achados necroscópicos é executada, via de regra, pelo médico legista executor da necropsia e deverá constar no laudo de necropsia do cadáver periciado. Baseado no histórico, suspeita de

causa mortis e achados necroscópicos, o médico legista terá condições de coletar matrizes biológicas e requisitar uma análise toxicológica direcionada. Se o legista não requisitar especificamente a análise toxicológica desejada, a responsabilidade dessa decisão recai sobre o toxicologista responsável por conduzir a investigação toxicológica, baseado também no histórico do caso e nos resultados necroscópicos (LEVINE; SMITH; FROEDE, 1990).

A primeira etapa para efetuar uma solicitação de análise toxicológica é definir qual seria a finalidade da análise. Uma vez estabelecida a finalidade, a análise pode ser melhor orientada quanto à seleção da matriz e os demais procedimentos. A seleção da amostra, então, depende da finalidade da análise, da natureza química do analito suspeito, sua forma e concentração e de outros parâmetros que se deseja levar em consideração (DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2002).

Nas análises *postmortem*, as matrizes biológicas disponíveis são variadas e devem ser selecionadas com base no histórico do caso. Sempre que possível, o sangue é a amostra de eleição a ser coletado, seguido de urina e fragmentos de vísceras, como o fígado (DRUMMER; GEROSTAMOULOS, 2002).

Outras amostras podem ser coletadas para análises mais específicas, como humor vítreo, cérebro e pulmões para suspeita de agentes tóxicos voláteis, conteúdo gástrico para exposição oral a agentes tóxicos, dentre outros (SKOOP, 2004).

Atualmente, também se estimula a coleta de fêneros, como unhas e cabelos, para avaliação da exposição prolongada a metais e exposições intraútero. Além disso, larvas de insetos encontradas no corpo putrefeito também podem servir de matriz para a pesquisa do toxicante que esteve no corpo (DRUMMER, 2004).

3.4.2 Análise Toxicológica

Não é possível para todos os casos testar todas as substâncias químicas existentes. Vários fatores ou variáveis determinam o tipo e a quantidade de análises toxicológicas que deverão ser executadas (DRUID; HOLMGREN, 1998).

A análise de uma substância química no meio ambiente e em organismos depende do desenvolvimento de técnicas analíticas. Apesar da introdução de novas tecnologias no mercado, o processo analítico básico mantém-se inalterado, compreendendo: qualificação; isolamento do composto de interesse; remoção de interferentes analíticos; quantificação e interpretação do resultado (LEIDY, 2004).

Portanto, a decisão sobre o método analítico a ser empregado depende de um número de fatores. Um deles é o volume de amostra que o método exige. O montante de material disponível é crítico na determinação do método, uma vez que as amostras forenses são exíguas e raramente permitem recoletas (BRANCH, 2004).

Outro fator é a natureza química da substância de interesse a ser pesquisada, pois essa natureza determinará os aspectos do aparato instrumental. E por fim, é necessário considerar as vantagens tecnológicas da instrumentação a ser utilizada, como eficiência, limites dos detectores, limitações técnicas, dentre outros (BRANCH, 2004).

Um diagnóstico toxicológico consistente baseia-se em uma análise toxicológica eficiente. Selecionar o método de análise mais apropriado dentre as inúmeras possibilidades é tarefa desafiadora para o toxicologista (DRUMMER, 2007).

Para executá-la, o primeiro passo é determinar a abrangência do que está sendo requisitado. Sendo assim, os métodos são divididos em:

- Métodos de triagem
- Métodos confirmatórios

3.4.2.1 Métodos de triagem

Os métodos de triagem são métodos gerais, quando não se conhece o analito a ser pesquisado. Normalmente são empregados para verificar a presença de uma classe de compostos e são de utilização comum no âmbito clínico. Devem fornecer uma identificação presuntiva do agente tóxico, ou ao menos a classe a qual o agente pertence (BAILEY, 1986; MAURER, 1999; FROST et al., 2012).

Alguns métodos de triagem também fornecem dados indicativos sobre a quantidade do agente presente na amostra (BAILEY, 1986).

Nas intoxicações agudas que resultam em óbito é de se esperar que os níveis do agente tóxico causador do evento esteja elevado no sangue e também na urina. Por esse motivo, e por ser uma matriz mais simples, a urina é a matriz de escolha para uma triagem mais abrangente (BAILEY, 1986).

O sangue total é a matriz de escolha para etapas de quantificação do analito. É a matriz que permite correlacionar causa e efeito com maior precisão. Se a concentração do analito no sangue for suficientemente elevada, o mesmo também

pode ser utilizado para triagem. Essa possibilidade é vantajosa quando o sangue é a única matriz coletada ou disponível, ou quando o procedimento de triagem permite quantificação simultânea (DRUMMER, 2007).

A escolha do método de triagem é fundamental. Este deverá ter boa sensibilidade e capacidade de detectar uma gama de compostos diferentes (LINDEN; FASSINA, 2003).

O método deve ser escolhido tendo-se em conta as amostras disponíveis, grupo de substâncias de interesse e a técnica analítica adequada. Além disso, protocolos de triagem devem incluir testes capazes de detectar o maior número possível de substâncias, levando-se em conta as matrizes disponíveis, o fluxo do laboratório e o histórico do caso (OSSELTON, 1992; LINDEN; FASSINA, 2003).

Muitos laboratórios não dispõem de recursos para aplicar testes seriados até a exclusão de todas as substâncias possíveis de serem detectadas. Esse tipo de procedimento seria desejável para os casos onde há forte indício de envenenamento, mas, na prática, são aplicados alguns testes padrões capazes de eliminar não todas, mas uma grande parcela das substâncias possivelmente causadoras do óbito ou dano (OSSELTON, 1992; BAILEY, 1996).

Dentre os testes de triagem, os imunoensaios são muito empregados na área clínica e podem ser utilizados também na área forense, tendo-se a urina como matriz de eleição. Em casos onde não há disponibilidade da urina, alguns imunoensaios podem ser realizados em sangue e também em macerados de vísceras, com o devido preparo (LINDEN; FASSINA, 2003).

Além dos imunoensaios, são frequentemente utilizadas as cromatografias em camada delgada. Tal técnica apresenta vantagem em relação ao baixo custo e alta sensibilidade. Por outro lado, exige experiência do pesquisador para garantir boa reprodutibilidade, é sensível a variações do ambiente de trabalho (temperatura, pressão, umidade, dentre outros) e de pouca especificidade (LINDEN; FASSINA, 2003).

Quando essas técnicas são insuficientes, de forma isolada, frente à variedade de substâncias prováveis em um caso, necessita-se de uma estratégia mais extensiva, ou seja, de uma rotina de análise toxicológica sistemática com emprego de métodos mais abrangentes ou sequenciais (LINDEN; FASSINA, 2003).

Todos os resultados positivos obtidos através dos métodos de triagem devem ser confirmados e agentes tóxicos relevantes devem ser quantificados (CHEN et al., 1995).

3.4.2.2 Métodos confirmatórios

Os resultados encontrados por meio de técnicas de triagem devem ser confirmados por técnicas analíticas de princípio químico diferente daquele da triagem e com parâmetros analíticos em níveis mais refinados, como elevada especificidade (FLANAGAN, 2004).

Para tal, é comum o uso de cromatógrafos gasosos acoplados à espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatógrafos líquidos acoplados à espectrômetro de massas (CL-EM). É comum também a utilização desses cromatógrafos, gasosos e líquidos, a outros tipos de detectores como o de ionização por chama (CG-DIC), arranjo de diodos (CLAE-DAD), dentre outros (FLANAGAN, 2004).

Testes confirmatórios são necessários para firmar a identidade da substância identificada com razoável certeza científica e quantificá-la dentro de padrões estatísticos aceitáveis (CHASIN, 2001).

A essência da confirmação é prover evidências robustas suficientes para que a conclusão sobre o resultado alcançado seja a mesma se o caso fosse submetido à revisão por outros toxicologistas tecnicamente competentes (CHASIN, 2001).

3.4.2.3 Estado da arte atual

O rápido desenvolvimento da cromatografia líquida e da espectrometria de massas na última década evoluiu para uma técnica estabelecida e está se tornando uma poderosa ferramenta de detecção sensível de fármacos em matrizes de diferentes amostras. Durante os últimos 15 anos a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM) ou a espectrometria de massa em *tandem* (CLAE-EM/EM) tornaram-se técnicas sedimentadas com muitas aplicações tanto na química clínica quanto na toxicologia forense (VIETTE et al., 2011; AMUNDSEN et al., 2013)

Todas estas técnicas se mostram cada vez mais eficientes e capazes de identificar cada vez um número maior de substâncias e em quantidades cada vez

menores. De fato, nos últimos anos, dentro da União Européia e nos EUA, novas moléculas psicoativas surgiram, muitas vezes em "inocentes" aparências (desodorizadores de ambiente, sais de banho, incensos) e, como são moléculas novas, sem padrões analíticos para sua identificação (FAVRETTO; PASCALI; TAGLIARO, 2013).

A necessidade de técnicas mais apuradas se faz necessário para um *screening* toxicológico confiável e que realmente gere resultados confiáveis. Muitas vezes os imunoensaios, cuja especificidade depende da afinidade e a reatividade cruzada dos anticorpos utilizados para o fármaco, os seus análogos e os seus metabólitos, geram resultados duvidosos. Mais recentemente, a disponibilidade de técnicas de alta produtividade baseadas em cromatografia líquida acoplada a triplos quadrupolos tem permitido a difusão da "abordagem por cromatografia" também neste *screening* toxicológico (FAVRETTO, PASCALI e TAGLIARO, 2013).

Uma vez que o objetivo do *screening*, ou triagem, é a identificação de todas as amostras presuntivamente "positivas" (isto é, positivo para qualquer droga de abuso ou fármaco de interesse médico-legal), a possibilidade de uma perda de resultados "positivos" é particularmente relevante. Versace et al. (2012) e Amundsen et al. (2013), fazendo uso dessas técnicas de alta capacidade, mostram que é possível realizar uma triagem de maneira confiável, mas trazem à tona uma discussão de que não é possível identificar todas as substâncias, uma vez que a natureza química das mais variadas substâncias não possibilita uma etapa de extração adequada da matriz biológica.

Dentro deste contexto de diversidade química das amostras, os métodos analíticos encontrados na literatura muitas vezes se restringem a um grupo de substâncias. As condições estabelecidas para este grupo de substâncias muitas vezes restringem demasiadamente o *screening* toxicológico (SAMPEDRO et al., 2012; VERPLAETSE; TYTGAT, 2012; VERSACE et al. 2012).

Recentemente Broecker, Herre e Pragst (2012) utilizando cromatografia líquida com espectrometria de massa e tempo-de-vôo (LC-QTOF-MS) propuseram um *screening* toxicológico através do cabelo como matriz biológica. Mesmo sendo uma metodologia que propõe a identificação de uma ampla gama de compostos, o autor relata que procedimentos de digestão de cabelo são inadequados por causa da degradação do analito e a extração aquosa em um pH ácido ou neutro tem a

desvantagem de excluir espécies lipofílicas. Tal efeito pode ser estendido a outras matrizes biológicas.

A realidade brasileira mostra que estas técnicas estão muito distantes dos laboratórios forenses. A necessidade de uma tecnologia instrumental atualizada contrapõe-se com a falta de incentivo dos órgãos governamentais provocando um inchaço de trabalho e o sucateamento dos laboratórios. Desta maneira, muitos laboratórios se vêem obrigados a utilizar técnicas mais rudimentares de pesquisa que demandam de tempo e nem sempre produzem resultados irrefutáveis, pois não se dispõe de padrões para identificação química ou meios para validação adequada de métodos.

No estado do Paraná, são realizadas mais de 5 mil análises toxicológicas, por ano, em material pós-morte. Somente a cidade de Curitiba e região metropolitana são responsáveis por metade dessa casuística (cerca de 2.500 cadáveres necropsiados por ano) provenientes de mortes violentas ou suspeitas. Todos os cadáveres necropsiados pelo Instituto Médico-Legal do Paraná demandam algum tipo de perícia toxicológica. Somente esta casuística já seria suficiente para justificar pesquisa, aquisição e implantação de técnicas de triagem eficientes tanto em termos analíticos quanto em termos administrativos, como custo e tempo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo tratavam-se de sangue total e urina coletadas de cadáveres necropsiados pelo Instituto Médico Legal do Paraná. A coleta dessas matrizes ocorreu no momento em que a necropsia cadavérica foi executada, e entre o período de janeiro de 2011 a julho de 2011.

Os coletadores, médicos legistas e auxiliares de necropsia, foram orientados para executar manobras de coleta já padronizadas pela Seção de Toxicologia, embasadas em literatura científica consolidada e sintetizada em um manual de coletas desenvolvido pelos Peritos da Seção.

Para coleta de sangue total, orientou-se realizar punção em veia femoral e coletar deste sítio um volume de sangue superior, pelo menos, a 5 mililitros. Tal matriz foi recolhida em frasco de vidro limpo, com capacidade de armazenamento de 60 mililitros, provido de tampa vedante de borracha e contendo em seu interior fluoreto de sódio como anticoagulante e preservante através de inibição enzimática.

Após coleta, os frascos contendo sangue foram acondicionados em geladeira, com temperatura entre 2 e 8 graus Celsius.

Após a designação, foi iniciado o processo pericial e a guarda do material passou a ser realizada sob congelamento em freezer, com temperatura inferior a -20 graus Celsius.

Para a coleta de urina, orientou-se realizar punção suprapúbica, atingindo a bexiga, e coletar toda a quantidade disponível de urina em frasco de vidro limpo, com capacidade de armazenamento de 60 mililitros, provido de tampa de borracha vedante e adicionado de fluoreto de sódio como preservante através de inibição enzimática.

Após coleta, os frascos contendo urina foram armazenados em geladeira, temperatura entre 2 a 8 graus Celsius.

Em momento seguinte à designação, iniciou-se o processo de perícia e o armazenamento do material passou a ser realizado sob congelamento em freezer, com temperatura inferior a -20 graus Celsius.

4.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS DE TRIAGEM

Para início do estudo, foram verificadas as técnicas analíticas disponíveis na Polícia Científica do Paraná e de interesse. Foram selecionadas duas técnicas de triagem com aplicação na área toxicológica: a cromatografia líquida de alta eficiência associada à detecção por arranjo de diodos e enzimoimunoensaio e quimioluminescência através de Biochip.

4.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada à Detector por Arranjo de Diodos.

Toda a avaliação, e consequente análise das amostras reais, foram conduzidas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD), ambos Hitachi – Merck.

Para operação do equipamento, foi utilizada interface EZChrom, capaz de monitorar e integrar de forma simultânea o cromatograma e os espectros ultravioletas gerados em cada comprimento de onda do DAD, e também sugerir identidade de substâncias através de algoritmo que calcula a similaridade entre os espectros gerados e os arquivados em biblioteca espectral.

Tanto as amostras de sangue quanto de urina foram preparadas para aplicação neste método segundo técnica sugerida por Pragst, Herzler e Erxleben (2005).

Para preparação das amostras, as mesmas foram deixadas descongelar em temperatura ambiente. Após descongelamento, foram submetidas à agitação através de agitador horizontal de bancada, tipo *shaker*, marca Ika, por 10 minutos a 140 rpm.

Após agitação, foram pipetados duas alíquotas de 500 microlitros de cada amostra em tubo tipo *eppendorf* para extração líquido-líquido, que resultará em um extrato ácido e um extrato básico.

Nos tubos que resultarão em extrato ácido, sobre os 500 microlitros de amostra foram pipetados 100 microlitros de ácido clorídrico 0,1M e 400 microlitros de diclorometano.

Nos tubos que resultarão em extrato básico, sobre os 500 microlitros de amostra foram pipetados 100 microlitros de tampão Tris, pH 12 e 400 microlitros de diclorometano.

Para as amostras suspeitas de serem positivas para benzodiazepínicos, anfetaminas ou opióides, procedeu-se, além da extração ácida e básica, extração direcionada. Para benzodiazepínicos foi utilizado 500 microlitros de amostra, 100 microlitros de tampão carbonato pH 9 e 400 microlitro de 1-clorobutano. Para anfetaminas foi utilizado 500 microlitros de amostra, 100 microlitros de solução saturada de NaOH e 400 microlitros de diclorometano. Para opióides, 500 microlitros de amostra, 100 microlitros de tampão carbonato pH 9 e 400 microlitros de isopropanol/clorofórmio.

Todos os tubos foram submetidos à agitação tipo *vortex* por 1 minuto e subsequente centrifugação por 5 minutos em centrífuga refrigerada a -10 graus Celsius.

Após a separação das fases, com o auxílio de uma microsseringa de vidro, pelo menos 100 microlitros da porção orgânica (diclorometano) de cada extrato foi retirada e transferida para um respectivo *vial* dotado de *insert*.

Os vials preenchidos com diclorometano proveniente de extratos ácidos e básicos foram deixados em capela para evaporação do solvente.

Após evaporação da fase orgânica, o conteúdo dos *vials* foi ressuspenso em 100 microlitros de fase móvel Acetonitrila/Tampão Fosfato pH 2,3 (37:63), homogeneizados por agitação em *vortex* e injetados 50 microlitros no CLAE-DAD.

Os parâmetros do CLAE e DAD foram ajustados de acordo com o descrito por Pragst e colaboradores (2005). As corridas cromatográficas foram conduzidas em coluna LiChrospher (Merck) RP8e, 5 micrometros, dimensões de 250 por 4 mm, com duração de 30 minutos cada em temperatura de 30 graus Celsius, com injeção de 10 microlitros de extrato sob temperatura de 20 graus Celsius.

Como fase móvel, foi utilizado mistura de acetonitrila e tampão fosfato (37:63 v/v) com pH 2,3, em fluxo de 1 mililitro por minuto.

Os tempos de retenção relativos e a varredura espectral produzida pelo detector foram comparados à biblioteca espectral, também desenvolvida por Pragst e colaboradores, a fim de identificar as possíveis substâncias presentes em cada amostra.

4.2.2 Biochip

Assim como nos imunoenaios clássicos, toda a etapa analítica foi executada segundo o manual técnico fornecido pelo fabricante, bem como utilizando os insumos fornecidos em cada *kit* reagente.

Cada kit reagente contém:

- 06 carregadores com 09 biochips cada um, totalizando 54 biochips;
- 09 soluções padrão para calibração;
- 01 tampão de lavagem;
- 01 frasco com luminol;
- 01 frasco com conjugado;
- 01 frasco com solução diluente de amostra;
- 01 frasco com solução diluente de ensaio;
- 01 frasco de solução de peroxidase
- 01 CD para programação do equipamento.

Quanto ao aparato instrumental propriamente dito, a técnica analítica conta com o uso de três módulos: um incubador com aquecimento e agitação orbital horizontal; um analisador provido de câmara de resfriamento e câmera fotossensível (Evidence Investigator) e um computador para operação do analisador e registro dos dados.

Para a análise de urinas, o incubador de amostras foi ligado com 30 minutos de antecedência do início das atividades para que atingisse a temperatura de 33 graus Celsius. No caso das análises de sangue, o incubador necessitava atingir 25 graus Celsius.

A solução de lavagem foi preparada através da diluição de 32 mililitros da solução de lavagem, proveniente do kit, em 1000 mililitros de água deionizada.

Tanto o computador quanto o analisador também foram ligados com antecedência ao início das etapas analíticas para que a programação das listas de trabalho fosse realizada e também para que a câmara de resfriamento do analisador adquirisse a temperatura recomendada de -56 graus Celsius, temperatura que diminui o espalhamento da luz a ser registrada.

Para prosseguimento do preparo, foram utilizados os insumos pertencentes aos kits identificados como DoA I Urina e DoA I WB.

Os 50 microlitros de cada amostra de urina foram diluídos em 200 microlitros de diluente de amostra. Já para o sangue, 50 microlitros de cada amostra foram diluído em 150 microlitros de diluente.

Das diluições em relação às urinas, 30 microlitros foram adicionados a 150 microlitros de diluente de ensaio e 120 microlitros de conjugado, previamente dispostos sobre cada biochip referente a cada amostra. Das diluições relativas ao sangue, 60 microlitros foram adicionados aos 150 microlitros de diluente de ensaio e 120 microlitros de conjugado já nos biochips.

Os carregadores, contendo 09 biochips cada um, foram então afixados à bandeja do incubador, que aqueceu as amostras a 33 graus Celsius no caso de urinas e 25 graus Celsius no caso de sangue, e agitou-as orbitalmente na horizontal a 330 rotações por minuto, por 30 minutos.

Antes de encerrar o período de incubação, foi preparada uma mistura de luminol e peroxidase na proporção de 1:1 e deixada repousar ao abrigo da luz.

Após período de incubação, os biochips foram lavados com a solução de lavagem preparada anteriormente. Tal operação se deu como recomendado pelo fabricante respeitando minimamente: 2 lavagens rápidas e 4 lavagens de 2 minutos para as urinas e 6 lavagens rápidas e 6 lavagens de 2 minutos para os sangues.

Ao fim dos ciclos de lavagem, foram adicionados a cada chip 250 microlitros da mistura luminol/peroxidase e deixados em temperatura ambiente por 2 minutos ao abrigo da luz.

Após este período, os carregadores foram introduzidos no analisador para que a leitura luminosa pudesse ser realizada pela câmera fotossensível e analisada pelo equipamento.

4.3 TÉCNICA ANALÍTICA CONFIRMATÓRIA

A técnica confirmatória utilizada como parâmetros de comparação foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM).

As análises por CLAE-EM/EM foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido Agilent 1200. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras Waters 2777 que durante as análises foi mantido a temperatura ambiente. Acetonitrila e metanol

foram utilizados separadamente como solvente de limpeza para o gerenciador de amostras.

O CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems), com fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

Os parâmetros do CLAE e do espectrômetro de massas foram ajustados de acordo com o descrito por Dresen e colaboradores (2010). Cada corrida cromatográfica teve a duração de 20 minutos, em temperatura ambiente, com a injeção de 30 microlitros de amostra. A eluição foi realizada com gradiente de fase móvel, iniciando com 10:90 de acetonitrila/tampão formiato, em fluxo de 0,5 mililitros por minuto. Em 10 minutos houve um aumento linear até atingir 90:10 acetonitrila/tampão formiato, em fluxo de 1 mililitro por minuto, condição esta mantida por 5 minutos. A condição inicial foi retomada em 1 minutos e mantida pelos 4 minutos finais.

Para preparação das amostras, as mesmas foram descongeladas em temperatura ambiente. Após descongelamento, foram agitadas através de agitador horizontal de bancada, marca Ika, por 10 minutos a 140 rpm.

Já homogeneizadas, 1 mililitro de sangue ou urina foi aliquoteado e provocado uma extração líquido-líquido utilizando 500 microlitros de tampão borato (pH 9), seguido da adição de 1,5 mililitros de 1-clorobutano como solvente extrator.

A solução foi agitada por, no mínimo, 4 minutos em *shaker* horizontal e depois centrifugada a frio, por 5 minutos.

Após a separação de fases, o sobrenadante orgânico foi transferido para um *eppendorf* e deixado secar em um concentrador de amostras.

Para injeção no cromatógrafo, o resíduo do extrato foi ressuspenso em 100 microlitros de fase móvel (90:10 v/v água/acetonitrila, ambas contendo 0,2% de ácido fórmico e 2mM de formiato de amônio) e injetado 30 microlitros pelo amostrador automatizado.

Os tempos de retenção, os fragmentos iônicos e as transições foram comparados com os padrões injetados, quais sejam: benzoilecgonina, cocaína, diazepam, clonazepam, oxazepam, bromazepam, metadona, morfina, heroína, codeína, anfetamina, fenciclidina, metanfetamina, MDMA, MDEA, MDA, THC, THCCOOH, lorazepam, flunitrazepam, nitrazepam, tramadol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Matrizes Biológicas

As matrizes biológicas coletadas foram sangue total e urina provenientes de cadáveres necropsiados no Instituto Médico-Legal do Paraná.

Para atingir o objetivo do trabalho de forma mais consistente, pode-se inferir que, para uma boa análise ou teste de técnicas analíticas, é interessante que as amostras testadas sejam suspeitas de serem positivas para alguma substância química. Foi necessário, portanto, introduzir uma tendência de seleção na etapa de amostragem, selecionando as amostras mais propensas a gerarem resultados analíticos mais interessantes, prováveis de acusar positivo para alguma substância.

Uma vez que a pesquisa intenta dissertar sobre uma comparação de técnicas analíticas, é necessário que se tenha o que comparar, de forma concreta. Se todas as amostras fossem negativas do ponto de vista toxicológico, não haveria o que ser comparado entre as técnicas testadas. Portanto, na etapa de amostragem, foram priorizadas as amostras biológicas provenientes de cadáveres com: histórico relatado de uso de drogas proscritas; histórico médico ou relatado de uso de substâncias químicas; causa do óbito relacionada ao uso de substâncias tóxicas; suspeita de uso de substâncias químicas; achados necroscópicos duvidosos e achados necroscópicos sugestivos de eventos relacionados ao uso de agentes tóxicos.

Da etapa de coleta, foram obtidas 154 amostras biológicas provenientes de cadáveres, conforme tabela1.

TABELA 1 – AMOSTRAS COLETADAS

Matriz	Quantidade Coletada
Sangue total	76
Urina	78
Total de amostras	154

FONTE: O autor (2013)

Após o procedimento de necropsia, cada amostra coletada recebeu uma primeira identificação oficial do Instituto Médico Legal referente ao cadáver humano a que pertencia. Essa identificação é alfanumérica, por exemplo SML 17, e foi

escrita no rótulo de cada frasco de amostra garantindo a originalidade e rastreabilidade da mesma.

Em um segundo momento, essa amostra, ao ser designada para um Perito Toxicologista, recebeu uma segunda identificação. Esta identificação é numérica, por exemplo 13734, e garante a autenticidade e rastreabilidade da amostra nos registros próprios da Seção de Toxicologia. É essa a identificação que originará o Laudo Pericial Toxicológico de mesmo número.

Para preservar a identidade do cadáver necropsiado, resguardar o Laudo Toxicológico emitido pela Perícia Oficial, simplificar e ordenar de forma lógica os registros, as amostras coletadas e selecionadas para compor a população desta pesquisa foram renumeradas, sendo-lhes atribuída nova identificação alfanumérica única, sequencial e exclusiva para uso do corrente estudo. A matriz identificadora pode ser analisada na tabela 2.

TABELA 2 – MATRIZ PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS

Continua

Amostras			
Sangue		Urina	
Registro Toxicologia	Registro Pesquisa	Registro Toxicologia	Registro Pesquisa
53	S1	53	U1
219	S2	91	U2
221	S3	214	U3
225	S4	246	U4
246	S5	473	U5
265	S6	601	U6
327	S7	616	U7
7920	S8	648	U8
7921	S9	652	U9
8395	S10	1012	U10
9874	S11	1115	U11
9902	S12	1116	U12
9966	S13	1195	U13
10131	S14	1201	U14
10162	S15	1211	U15
10166	S16	1519	U16
10178	S17	2061	U17
10257	S18	2101	U18
10284	S19	2236	U19
10463	S20	2241	U20

Continuação

Amostras			
Sangue		Urina	
Registro Toxicologia	Registro Pesquisa	Registro Toxicologia	Registro Pesquisa
10615	S21	2493	U21
10638	S22	2691	U22
10673	S23	3996	U23
10693	S24	4441	U24
11146	S25	4493	U25
11180	S26	5005	U26
11306	S27	5009	U27
11309	S28	5011	U28
11331	S29	5013	U29
11343	S30	5014	U30
11476	S31	5351	U31
11485	S32	5352	U32
11511	S33	5355	U33
11528	S34	5356	U34
11566	S35	5360	U35
11604	S36	5361	U36
11605	S37	5530	U37
11607	S38	5535	U38
11608	S39	5582	U39
11609	S40	5590	U40
11727	S41	5619	U41
11738	S42	5815	U42
11745	S43	6102	U43
11747	S44	6530	U44
11803	S45	6595	U45
11809	S46	6742	U46
11998	S47	6774	U47
12008	S48	6776	U48
12014	S49	7920	U49
12018	S50	10166	U50
12019	S51	10207	U51
12034	S52	10463	U52
12038	S53	10699	U53
12163	S54	10701	U54
12164	S55	11180	U55
12165	S56	11306	U56
12186	S57	11309	U57
12192	S58	11343	U58
12322	S59	11476	U59
12455	S60	11604	U60
12461	S61	11605	U61

Conclusão			
Amostras			
Sangue		Urina	
Registro Toxicologia	Registro Pesquisa	Registro Toxicologia	Registro Pesquisa
12470	S62	11606	U62
12517	S63	11607	U63
12552	S64	11609	U64
12555	S65	11998	U65
12557	S66	12008	U66
12592	S67	12018	U67
12861	S68	12019	U68
12865	S69	12163	U69
12980	S70	12164	U70
12996	S71	12186	U71
13063	S72	12455	U72
13112	S73	12841	U73
13118	S74	12861	U74
13421	S75	13063	U75
13560	S76	13118	U76
		13560	U77
		13734	U78

FONTE: O autor (2013)

5.2 AVALIAÇÃO ANALÍTICA

Após as etapas de coleta e seleção de amostras para a pesquisa em tela, foi iniciada a etapa de avaliação das técnicas analíticas propostas para estudo.

Por se tratar de técnicas cujo principal objetivo é gerar um resultado qualitativo, a avaliação das mesmas não exige a determinação de significativo número de figuras de mérito quando comparado com técnicas quantitativas e confirmatórias.

Sendo assim, a avaliação proposta restringe-se ao mínimo para garantir o adequado funcionamento do método analítico utilizado.

5.2.1 Biochip Array

A análise toxicológica através de “biochip” é novidade e não existem muitos estudos publicados no Brasil.

Tal técnica analítica conjuga em seu método de análise os princípios de enzimoimunoensaio e quimioluminescência com uso de um biochip impregnado, através de nanotecnologia, de anticorpos dirigidos contra agentes tóxicos em 13 regiões discretas ou microrregiões do chip.

Toda a etapa de avaliação, bem como as posteriores análises das amostras de estudo, foi conduzida em equipamento Evidence Investigator, propriedade da Randox. O procedimento de avaliação da técnica é fechado, padronizado pela empresa, e obrigatório antes do pleno funcionamento da técnica.

Apesar do objetivo do presente estudo ser apropriar-se dos resultados obtidos através da técnica de biochip de forma qualitativa, o fabricante da tecnologia em questão divulga que a técnica gera resultados semi-quantitativos. Por isso, e também por trabalhar com *cut offs*, para esta técnica a etapa de avaliação foca-se no desenvolvimento de curvas de calibração para cada grupo de substâncias analisadas.

Nessa pesquisa foram utilizados dois tipos de chips: para detectar agentes tóxicos em urina (DoA I Urine) e para detectar agentes tóxicos em sangue (DoA I WB).

Cada biochip recebe uma amostra e é capaz de detectar 10 tipos de substâncias ou classes de substâncias. As substâncias ou classes de substâncias passíveis de detecção são:

- Anfetaminas
- Barbitúricos
- Benzodiazepínicos I
- Benzodiazepínicos II
- Canabinóides
- Benzoilecgonina
- Metanfetamina
- Metadona
- Opiáceos
- Fenciclidina
- Creatinina (para o DoA I Urine apenas)

Esta técnica analítica emprega o uso de reagentes próprios da marca fornecidos pelo fabricante. Além do kit reagente, há também o fornecimento de um kit separado com as soluções que servirão de controle positivo alto e baixo.

Para o início do processo de avaliação, seguiram-se as etapas recomendadas para o correto uso da técnica em questão e já apresentadas em tópico anterior.

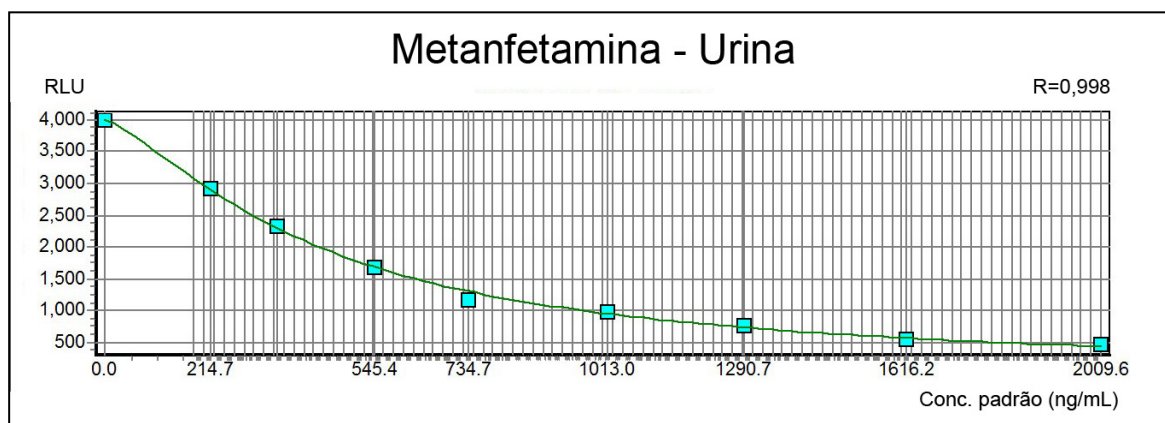
Da análise resultaram os valores de Unidade de Luminosidade Relativa (RLU) de cada amostra de solução padrão e pode-se então estabelecer as curvas de calibração para cada substância ou classe de substância analisadas.

A) Metanfetamina

TABELA 3 – CURVA DE METANFETAMINA – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3999
Cal 2	214,7	2908
Cal 3	349,6	2318
Cal 4	545,4	1687
Cal 5	734,7	1174
Cal 6	1013,0	982
Cal 7	1291,0	767
Cal 8	1616,0	550
Cal 9	2010,0	457

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

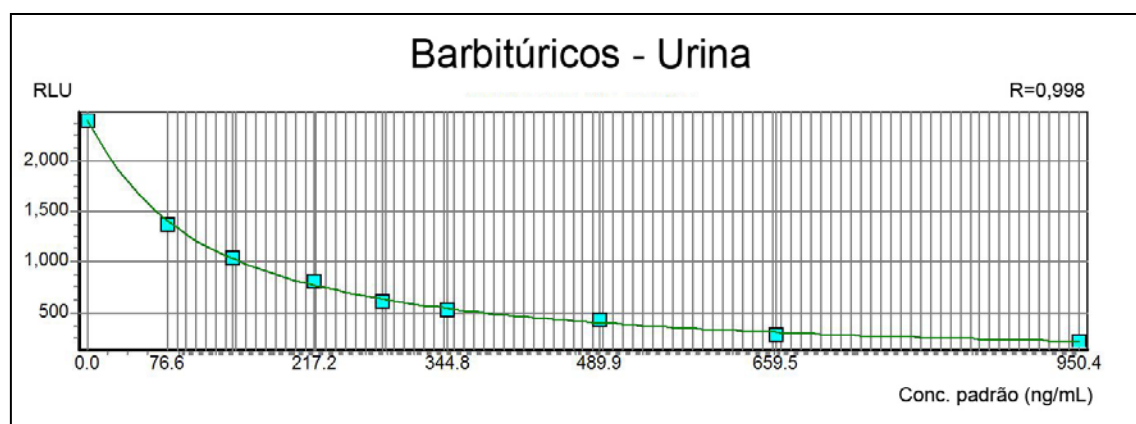
FIGURA 1 – Curva de calibração da Metanfetamina – urina

B) Barbitúricos

TABELA 4 – CURVA DE BARBITÚRICOS – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	2392
Cal 2	76,6	1374
Cal 3	139,0	1049
Cal 4	217,2	817
Cal 5	282,5	616
Cal 6	344,8	534
Cal 7	489,9	427
Cal 8	659,5	284
Cal 9	950,4	224

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

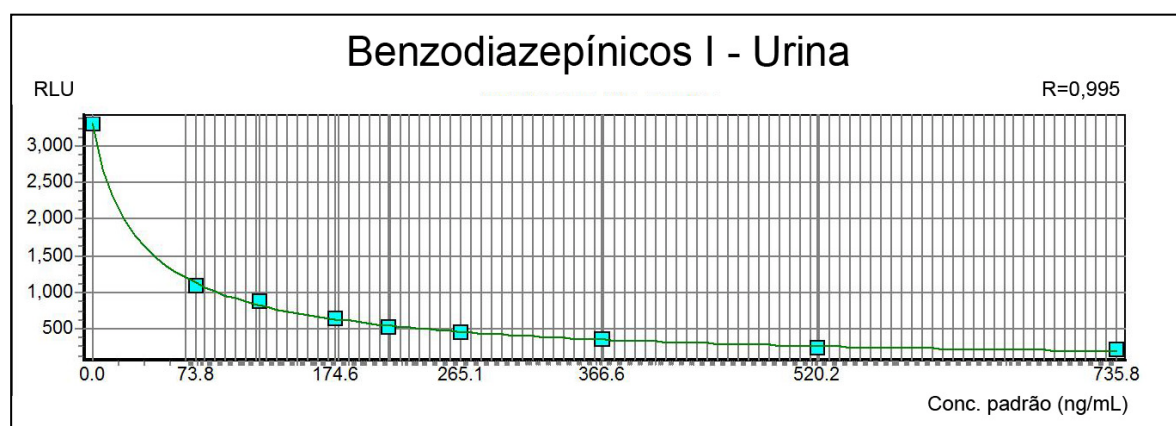
FIGURA 2 – Curva de calibração de Barbitúricos – urina

C) Benzodiazepínicos I

TABELA 5 – CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS I – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3303
Cal 2	73,76	1087
Cal 3	119,3	894
Cal 4	174,6	658
Cal 5	212,9	536
Cal 6	265,1	468
Cal 7	366,6	357
Cal 8	520,2	253
Cal 9	735,8	218

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

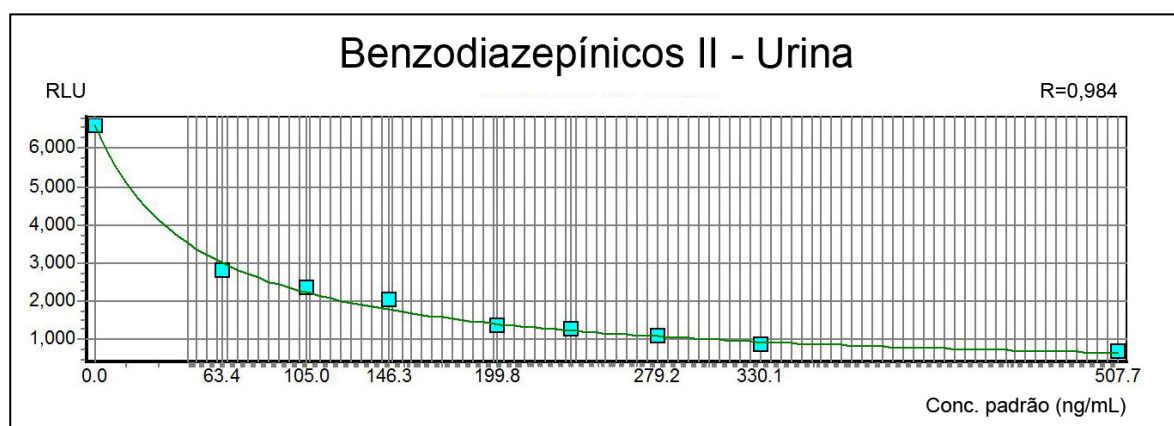
FIGURA 3 – Curva de calibração de Benzodiazepínicos I – urina

D) Benzodiazepínicos II

TABELA 6 – CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS II – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0.0	6608
Cal 2	63,4	2809
Cal 3	105,0	2351
Cal 4	146,3	2032
Cal 5	199,8	1350
Cal 6	236,4	1269
Cal 7	279,2	1116
Cal 8	330,1	860
Cal 9	507,7	673

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

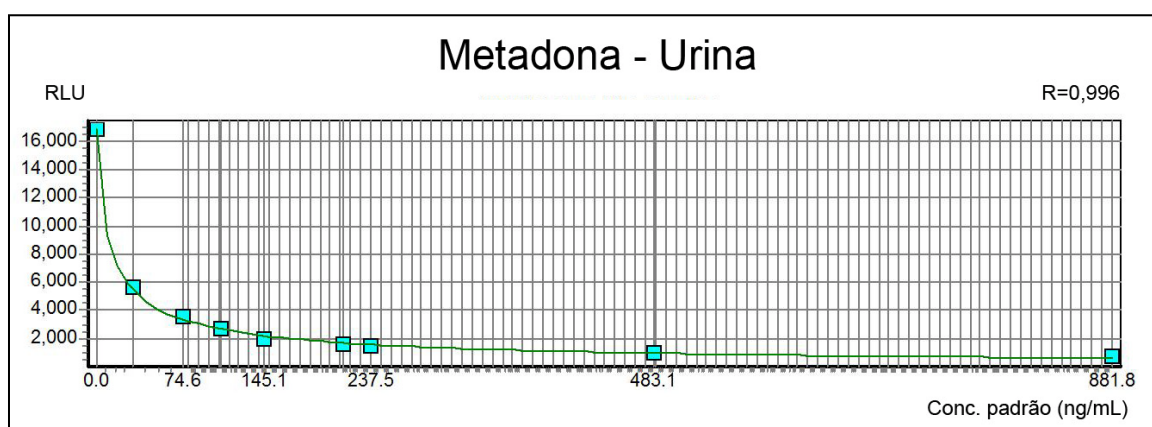
FIGURA 4 – Curva de calibração de Benzodiazepínicos II – urina

E) Metadona

TABELA 7 – CURVA DE METADONA – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	16829
Cal 2	31,3	5631
Cal 3	74,5	3532
Cal 4	107,4	2743
Cal 5	145,1	1946
Cal 6	213,9	1596
Cal 7	237,5	1507
Cal 8	483,1	952
Cal 9	881,8	762

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

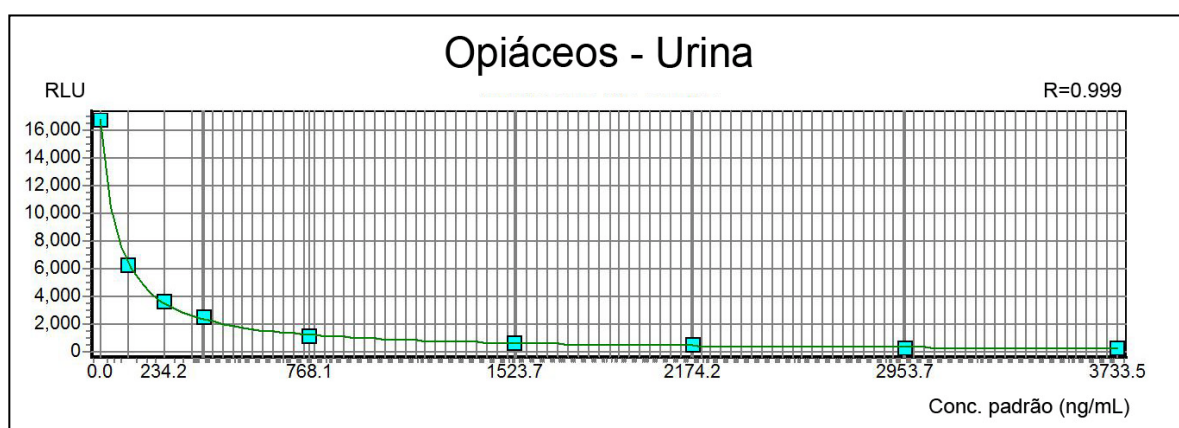
FIGURA 5 – Curva de calibração de Metadona – urina

F) Opiáceos

TABELA 8 – CURVA DE OPIÁCEOS – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	16726
Cal 2	101,2	6310
Cal 3	234,2	3591
Cal 4	380,1	2487
Cal 5	768,1	1200
Cal 6	1524,0	645
Cal 7	2174,0	481
Cal 8	2954,0	320
Cal 9	3733,0	282

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

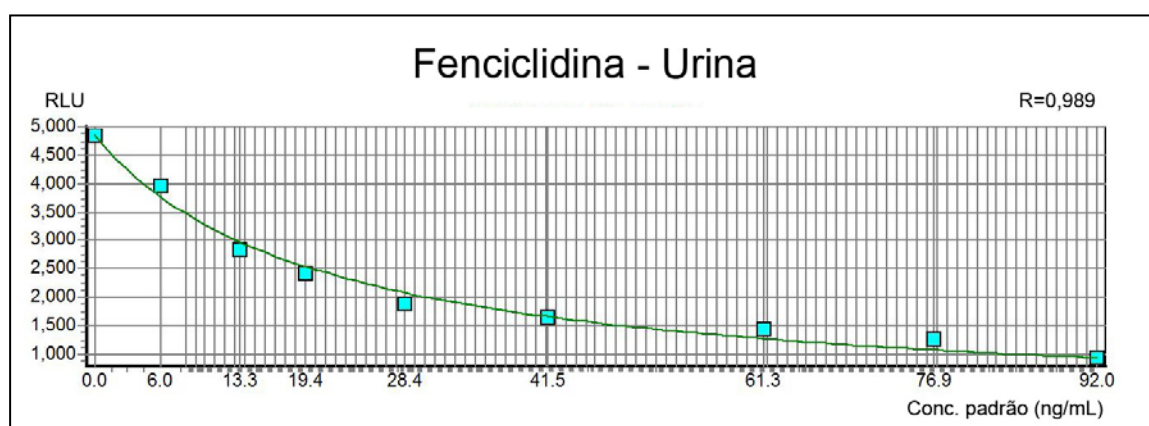
FIGURA 6 – Curva de calibração de Opiáceos – urina

G) Fenciclidina

TABELA 9 – CURVA DE FENCICLIDINA – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	4856
Cal 2	6,0	3958
Cal 3	13,2	2840
Cal 4	19,3	2428
Cal 5	28,4	1897
Cal 6	41,5	1660
Cal 7	61,3	1428
Cal 8	76,9	1247
Cal 9	92,0	948

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

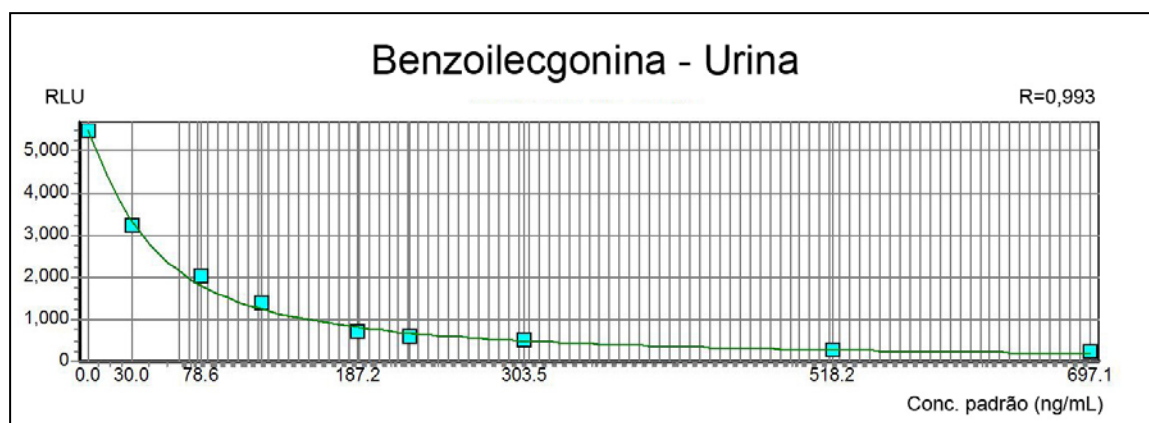
FIGURA 7 – Curva de calibração de Fenciclidina – urina

H) Benzoilecgonina

TABELA 10 – CURVA DE BENZOILECGONINA – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	5501
Cal 2	30,0	3252
Cal 3	78,5	2040
Cal 4	120,3	1377
Cal 5	187,2	703
Cal 6	223,4	569
Cal 7	303,5	507
Cal 8	518,2	255
Cal 9	697,1	217

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

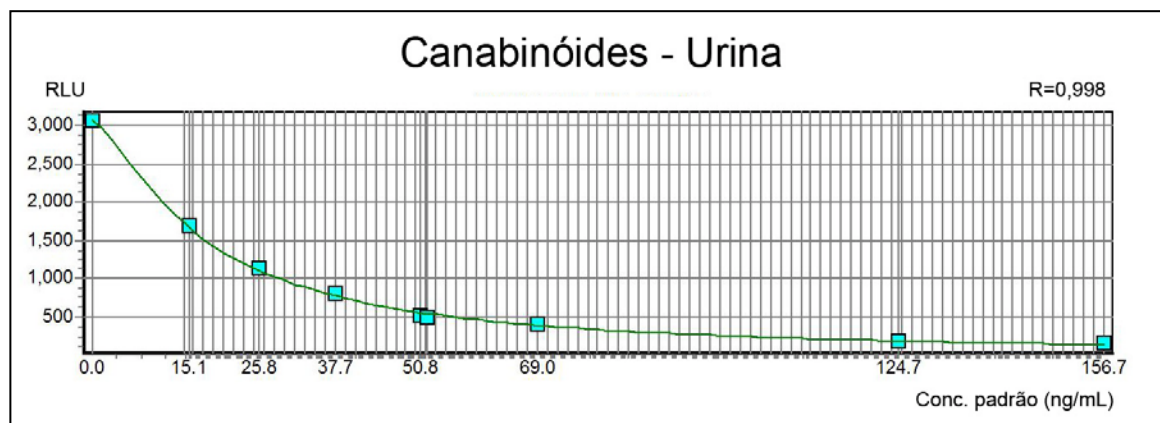
FIGURA 8 – Curva de calibração de Benzoilecgonina – urina

I) Canabinóides

TABELA 11 – CURVA DE CANABINÓIDES – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3073
Cal 2	15,1	1690
Cal 3	25,7	1138
Cal 4	37,7	793
Cal 5	50,7	521
Cal 6	51,8	488
Cal 7	69,0	404
Cal 8	124,7	175
Cal 9	156,7	162

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

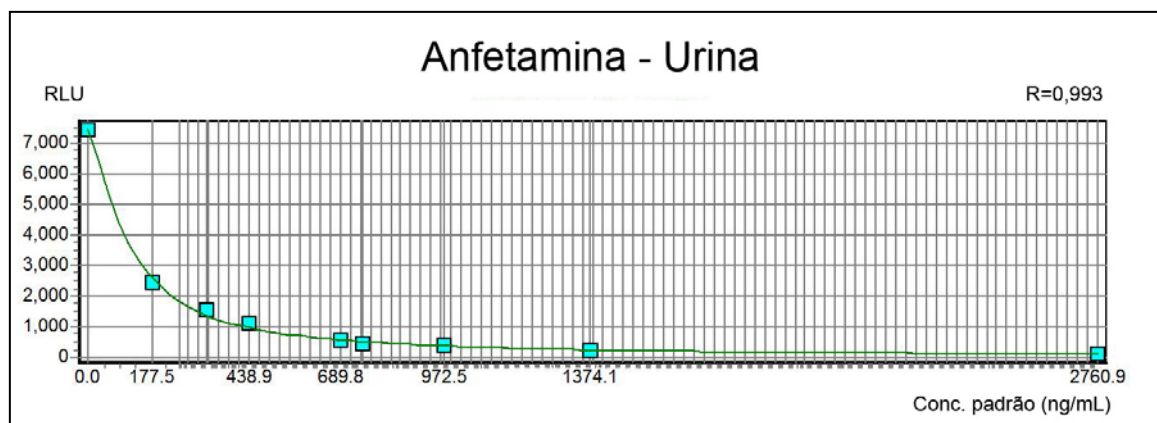
FIGURA 9 – Curva de calibração de Canabinóides – urina

J) Anfetamina

TABELA 12 – CURVA DE ANFETAMINA – URINA

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	7474
Cal 2	177,5	2418
Cal 3	323,7	1540
Cal 4	438,9	1097
Cal 5	689,8	506
Cal 6	751,5	438
Cal 7	972,5	360
Cal 8	1374,0	204
Cal 9	2761,0	97

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

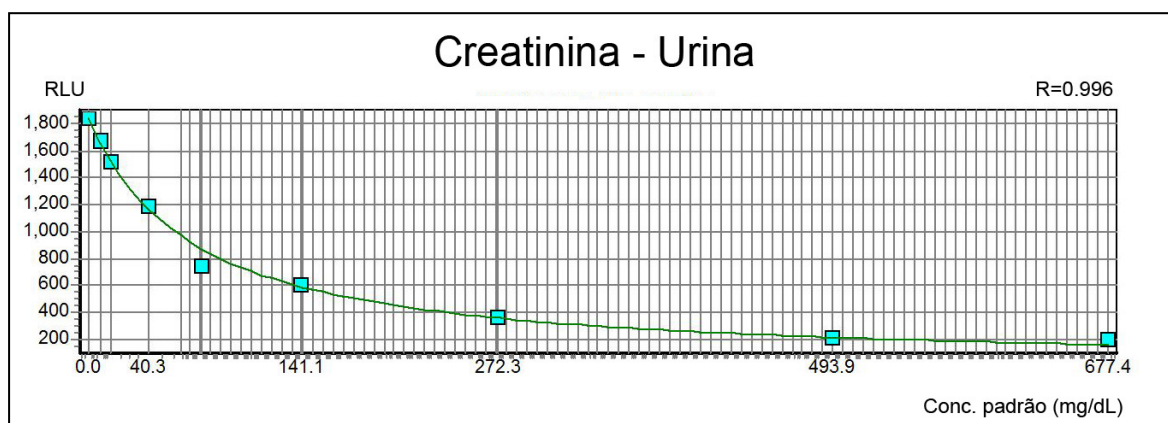
FIGURA 10 – Curva de calibração de Anfetamina – urina

K) Creatinina

TABELA 13 – CURVA DE CREATININA – URINA

Padrão	Concentração (mg/dL)	RLU
Cal 1	0,0	1839
Cal 2	7,7	1673
Cal 3	15,0	1523
Cal 4	40,3	1187
Cal 5	75,2	742
Cal 6	141,1	604
Cal 7	272,3	361
Cal 8	493,9	215
Cal 9	677,4	195

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 11 – Curva de calibração de Creatinina – urina

A tabela 14 resume a etapa de avaliação aventada para a técnica de triagem através de biochip, na urina, delimitando neste momento o intervalo analítico para cada substância ou grupo de substâncias.

TABELA 14 – RESUMO DA AVALIAÇÃO PARA BIOCHIP – URINA

Substância	Intervalo Analítico	Correlação
Metanfetamina	125,00 – 2000,00 ng/ml	0.998
Barbitúricos	9,40 – 950,00 ng/ml	0.998
Benzodiazepínicos I	0,60 – 735,00 ng/ml	0.995
Benzodiazepínicos II	1,10 – 507,00 ng/ml	0.984
Metadona	0,60 – 881,00 ng/ml	0.996
Opiáceos	0,80 – 3700,00 ng/ml	0.999
Fenciclidina	1,90 – 92,00 ng/ml	0.989
Benzoilecgonina	2,30 – 697,00 ng/ml	0.993
Canabinóides	3,60 – 156,00 ng/ml	0.998
Anfetamina	8,10 – 2760,00 ng/ml	0.993
Creatinina	3,60 – 677,00 mg/dL	0.996

FONTE: O autor (2013)

Concluída a avaliação da técnica de biochip para a urina, iniciou-se a etapa de avaliação da técnica de biochip para o sangue total.

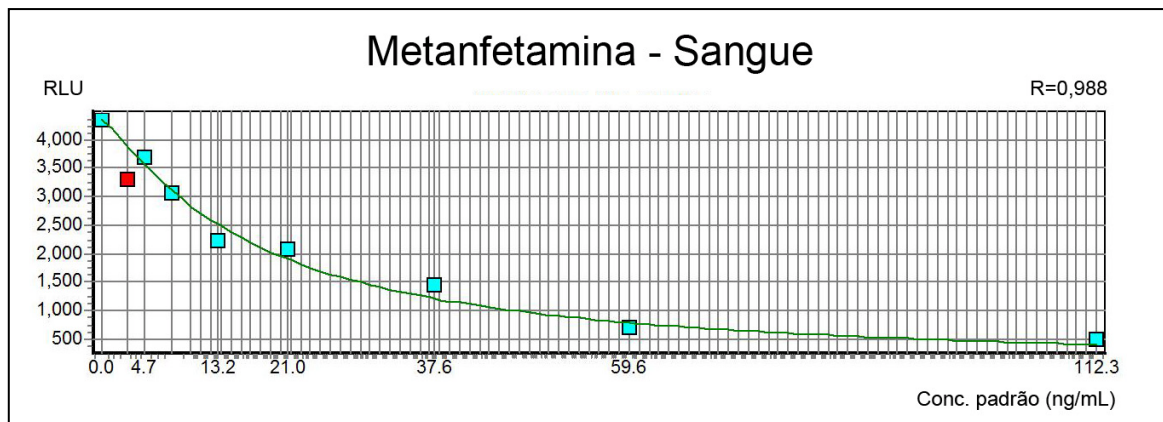
Assim como anteriormente, da análise resultaram os valores de Unidade de Luminosidade Relativa (RLU) de cada amostra de solução padrão e pode-se então estabelecer as curvas de calibração para cada substância ou classe de substância analisada.

L) Metanfetamina

TABELA 15 – CURVA DE METANFETAMINA – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	4344
Cal 2	2,8	3298
Cal 3	4,7	3677
Cal 4	7,9	3070
Cal 5	13,1	2222
Cal 6	21,0	2070
Cal 7	37,6	1468
Cal 8	59,5	702
Cal 9	112,3	494

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

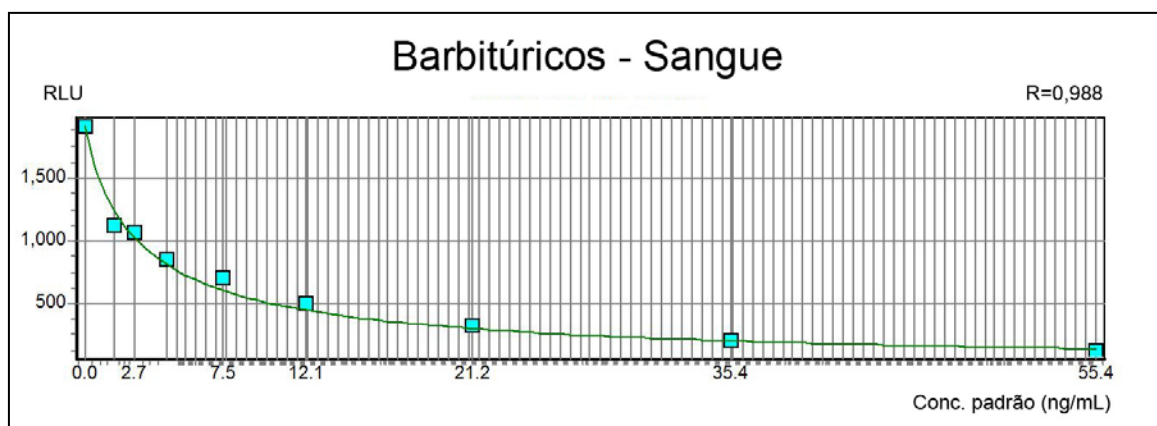
FIGURA 12 – Curva de calibração da Metanfetamina – sangue

M) Barbitúricos

TABELA 16 – CURVA DE BARBITÚRICOS – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	1901
Cal 2	1,6	1119
Cal 3	2,7	1071
Cal 4	4,5	850
Cal 5	7,5	706
Cal 6	12,1	499
Cal 7	21,2	326
Cal 8	35,4	201
Cal 9	55,4	126

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

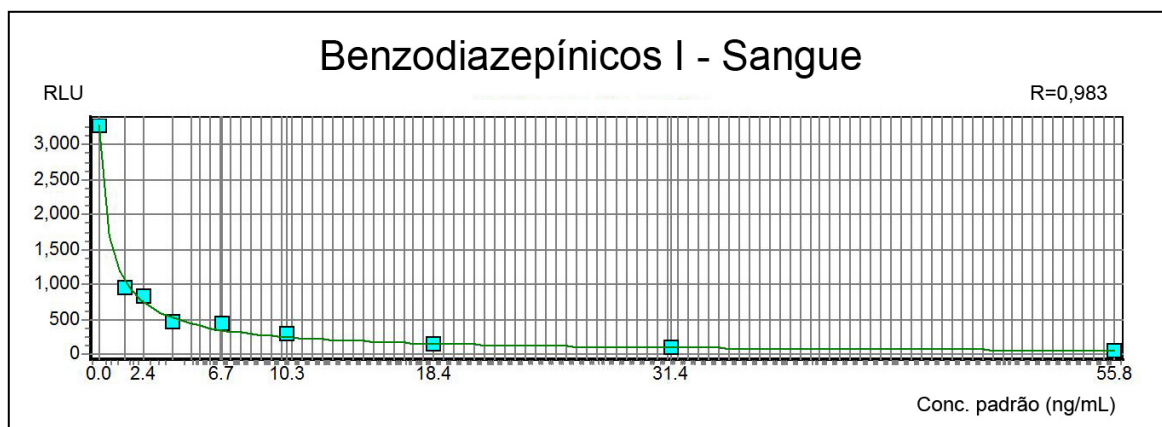
FIGURA 13 – Curva de calibração de Barbitúricos – sangue

N) Benzodiazepínicos I

TABELA 17 – CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS I – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3267
Cal 2	1,4	952
Cal 3	2,4	830
Cal 4	4,0	461
Cal 5	6,7	458
Cal 6	10,2	294
Cal 7	18,3	163
Cal 8	31,3	104
Cal 9	55,7	57

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

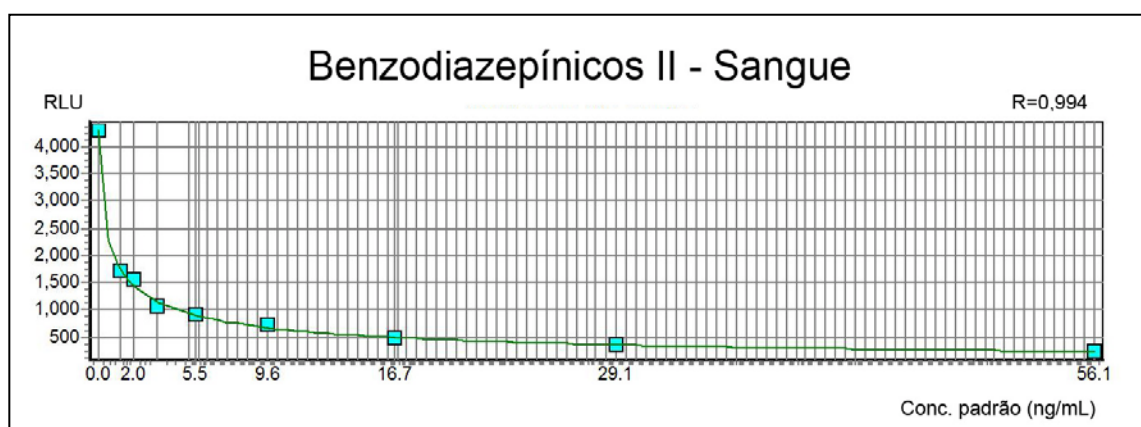
FIGURA 14 – Curva de calibração de Benzodiazepínicos I – sangue

O) Benzodiazepínicos II

TABELA 18 – CURVA DE BENZODIAZEPÍNICOS II – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	4292
Cal 2	1,1	1718
Cal 3	1,9	1571
Cal 4	3,2	1091
Cal 5	5,4	929
Cal 6	9,5	728
Cal 7	16,7	498
Cal 8	29,1	360
Cal 9	56,1	250

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

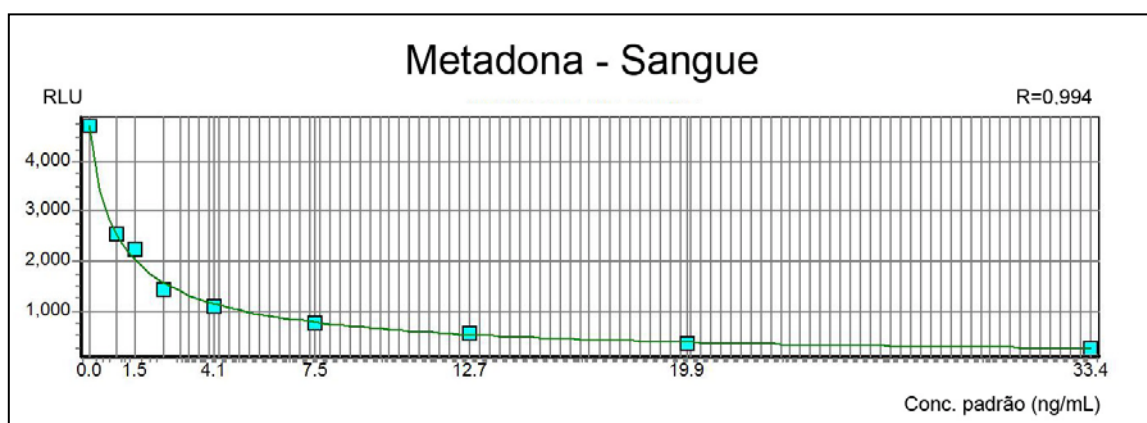
FIGURA 15 – Curva de calibração de Benzodiazepínicos II – sangue

P) Metadona

TABELA 19 – CURVA DE METADONA – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	4701
Cal 2	0,8	2539
Cal 3	1,4	2244
Cal 4	2,4	1426
Cal 5	4,1	1107
Cal 6	7,4	759
Cal 7	12,7	552
Cal 8	19,9	362
Cal 9	33,3	264

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

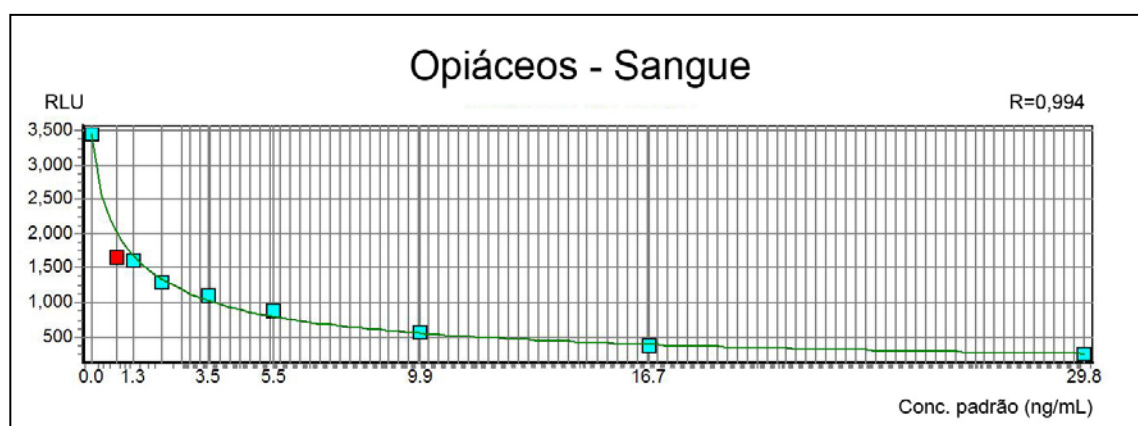
FIGURA 16 – Curva de calibração de Metadona – sangue

Q) Opiáceos

TABELA 20 – CURVA DE OPIÁCEOS – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3449
Cal 2	0,7	1663
Cal 3	1,2	1610
Cal 4	2,0	1286
Cal 5	3,4	1103
Cal 6	5,4	884
Cal 7	9,8	574
Cal 8	16,7	380
Cal 9	29,7	248

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

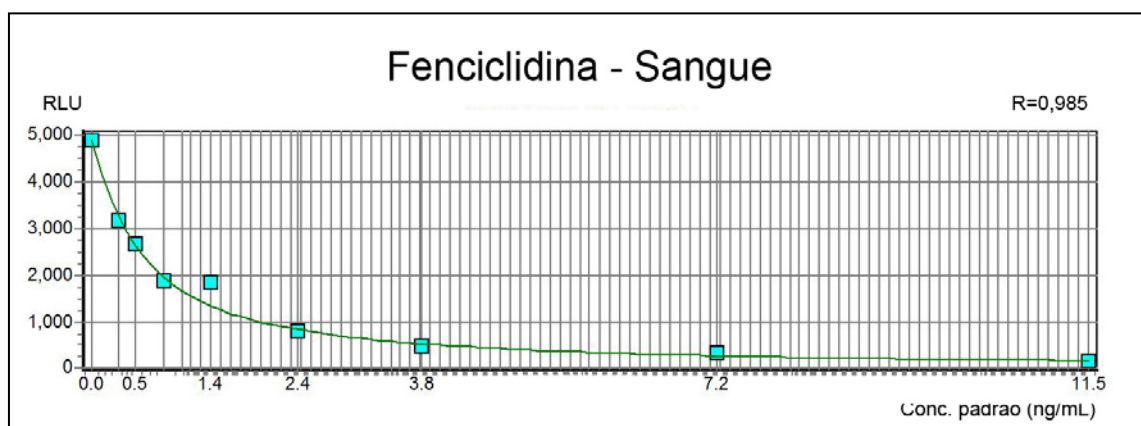
FIGURA 17 – Curva de calibração de Opiáceos – sangue

R) Fenciclidina

TABELA 21 – CURVA DE FENCICLIDINA – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	4904
Cal 2	0,3	3179
Cal 3	0,5	2678
Cal 4	0,8	1880
Cal 5	1,3	1844
Cal 6	2,3	795
Cal 7	3,8	491
Cal 8	7,2	337
Cal 9	11,5	158

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

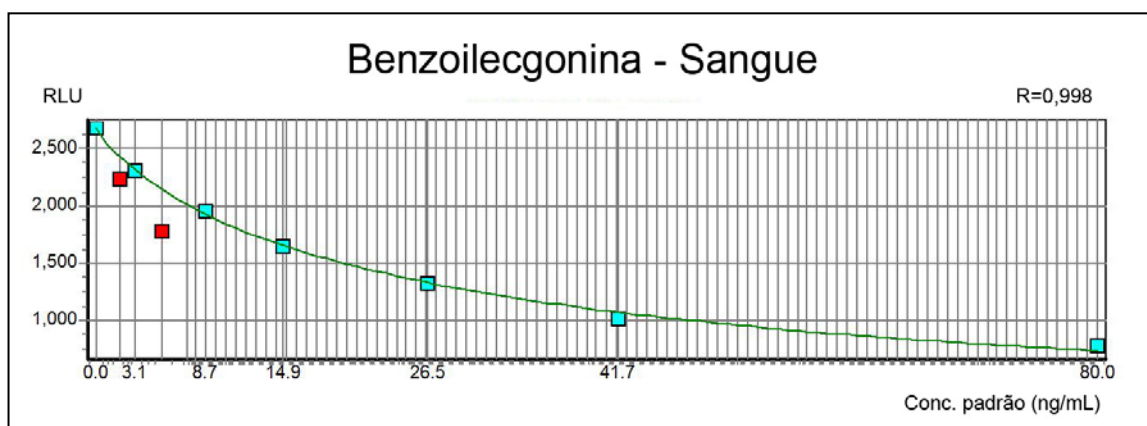
FIGURA 18 – Curva de calibração de Fenciclidina – sangue

S) Benzoilecgonina

TABELA 22 – CURVA DE BENZOILECGONINA – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	2678
Cal 2	1,8	2235
Cal 3	3,1	2306
Cal 4	5,2	1787
Cal 5	8,7	1958
Cal 6	14,9	1646
Cal 7	26,5	1326
Cal 8	41,6	1020
Cal 9	80,0	786

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

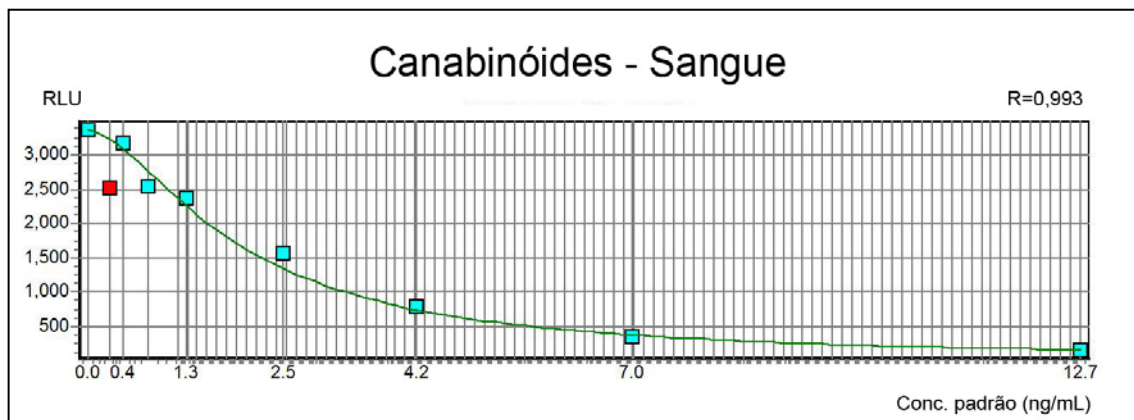
FIGURA 19 – Curva de calibração de Benzoilecgonina – sangue

T) Canabinóides

TABELA 23 – CURVA DE CANABINÓIDES – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3377
Cal 2	0,2	2522
Cal 3	0,4	3169
Cal 4	0,7	2542
Cal 5	1,2	2373
Cal 6	2,4	1556
Cal 7	4,2	783
Cal 8	6,9	344
Cal 9	12,6	153

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

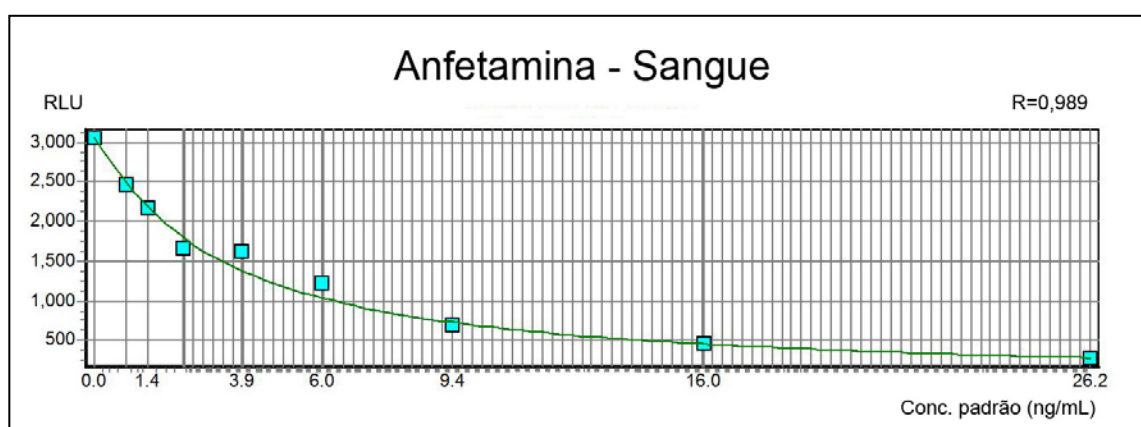
FIGURA 20 – Curva de calibração de Canabinóides – sangue

U) Anfetamina

TABELA 24 – CURVA DE ANFETAMINA – SANGUE

Padrão	Concentração (ng/mL)	RLU
Cal 1	0,0	3053
Cal 2	0,8	2472
Cal 3	1,4	2169
Cal 4	2,3	1671
Cal 5	3,8	1617
Cal 6	5,9	1213
Cal 7	9,4	702
Cal 8	16,0	456
Cal 9	26,2	275

FONTE: O autor (2013)



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 21 – Curva de calibração de Anfetamina – sangue

Assim como feito para a urina, a etapa de avaliação aventada para a técnica de triagem através de biochip, no sangue, pode ser resumida e apreciada na tabela 25. Também foi delimitado neste resumo o intervalo analítico para cada substância ou grupo de substâncias.

TABELA 25 – RESUMO DA AVALIAÇÃO PARA BIOCHIP – SANGUE

Substância	Intervalo Analítico	Correlação
Metanfetamina	2,84 – 112,30 ng/mL	0.988
Barbitúricos	1,62 – 55,43 ng/mL	0.988
Benzodiazepínicos I	1,45 – 55,75 ng/mL	0.983
Benzodiazepínicos II	1,19 – 56,10 ng/mL	0.994
Metadona	0,89 – 33,37 ng/mL	0.994
Opiáceos	0,75 – 29,79 ng/mL	0.994
Fenciclidina	0,30 – 11,51 ng/mL	0.985
Benzoilecgonina	1,88 – 80,00 ng/mL	0.998
Canabinóides	0,27 – 12,69 ng/mL	0.993
Anfetamina	0,84 – 26,22 ng/mL	0.989

FONTE: O autor (2013)

Ao analisar as curvas de calibração e as faixas de detecção geradas pela análise estatística do próprio programa da técnica de biochip, é interessante notar que a sensibilidade do método está na ordem de nanogramas por mililitro. Essa sensibilidade é comparável com técnicas analíticas sofisticadas, como as cromatografias acopladas a espectrometria de massas, e são faixas de detecção compatíveis com os níveis dos analitos em questão quando encontrados em matrizes biológicas reais (WINEK et al., 2001).

Na prática da toxicologia forense é comum o achado de analitos em concentrações superiores às terapêuticas, principalmente quando a substância pesquisada tem participação no desfecho letal.

Um outro achado relevante é que as curvas de calibração para urina não apresentaram pontos da curva rejeitados pela análise estatística da técnica. Todas as nove concentrações de cada padrão de urina obtiveram aceitação. O mesmo não aconteceu com os padrões sanguíneos. Pode-se observar que em algumas curvas em sangue alguns pontos de calibração foram rejeitados, e todos relativos a concentrações baixas de analito (figuras 12, 17, 19 e 20).

Tal fato pode ser explicado pela própria natureza da matriz sanguínea. Por ser uma matriz mais complexa que a urina, do ponto de vista de sua constituição química e possibilidade de interferentes, seria esperado que desvios ou maiores dificuldades analíticas ocorram nessa matriz biológica.

5.2.2 Cromatografia de Alta Eficiência acoplada a Detecção por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Durante a avaliação foram utilizados padrões de cada substância ou classe de substâncias afetas ao estudo:

- Anfetaminas: anfetamina, femproporex e mazindol
- Metanfetaminas: Metanfetamina, metilenodioximetanfetamina (MDMA) e metilenodioxietilamfetamina (MDEA)
- Barbitúricos: fenobarbital
- Benzodiazepínicos: diazepam, clonazepam, flunitrazepam, oxazepam, lorazepam, bromazepam, nitrazepam e midazolam
- Metadona
- Opióides: morfina, heroína e codeína
- Cocaína: benzoilmetilecgonina e benzoilecgonina
- THC: tetraidrocanabinol e seu ácido carboxílico

Para a técnica cromatográfica não é necessária a realização de curvas de calibração para cada analito ou classe de substâncias, e nem para cada matriz biológica, pois o método não demanda esse tipo de diligencia para operar, diferentemente da tecnologia de biochip.

Como o objetivo principal do estudo se baseia em uma análise qualitativa das substâncias de interesse forense, a simples identificação, sem a consequente quantificação da substância cromatografada, é resultado suficiente para o desfecho primário do estudo.

Sendo assim, as soluções padrões foram cromatografadas e os picos das substâncias foram identificados baseado em seus tempos de retenção relativo e similaridade espectral.

Deve-se considerar que o THC e seu ácido carboxílico, apesar de passíveis de serem cromatografados e identificados, necessitam de alterações na composição da fase móvel e também obtém um tempo de retenção muito superior ao tempo de corrida estipulado e padronizado para a técnica de triagem pelo CLAE-DAD. Sendo assim, esse fato inviabiliza que essas substâncias sejam prospectadas nas matrizes biológicas quando da utilização do método elencado para o estudo.

5.2.3 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas (CLAE-EM/EM)

Nessa técnica também foram utilizadas soluções padrões das substâncias de interesse, quais sejam:

- Anfetamina
- Metanfetaminas: Metanfetamina, metilenodioximetanfetamina (MDMA) e metilenodioxietilamfetamina (MDEA)
- Barbitúricos: fenobarbital
- Benzodiazepínicos: diazepam, clonazepam, flunitrazepam, oxazepam, lorazepam, bromazepam, nitrazepam e midazolam
- Metadona
- Opióides: morfina, heroína e codeína
- Cocaína: benzoilmetilecgonina e benzoilecgonina
- THC: tetrahydrocannabinol e seu ácido carboxílico

Assim como para a técnica de CLAE-DAD, a técnica confirmatória de CLAE-EM/EM não demanda a construção de curvas de calibração quando o objetivo da análise é verificar a identidade, a presença ou ausência de uma substância em uma amostra.

Para a caracterização das substâncias, foram injetadas as soluções padrões para obtenção dos tempos de retenção cromatográficos e visualização da detecção pelo espectrômetro de massas, através do monitoramento das transições e fragmentos iônicos.

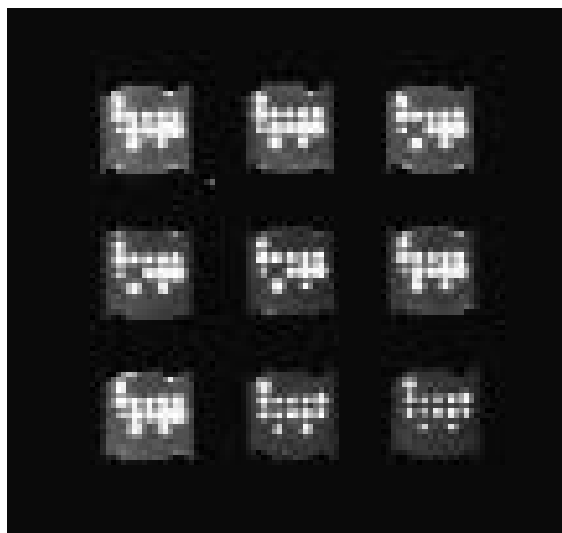
5.3 ANÁLISE TOXICOLÓGICA DAS AMOSTRAS REAIS

5.3.1 Análise Através de Biochip

Em etapa paralela e subsequente à avaliação analítica, foram analisadas as amostras do rol elencado para o estudo através da técnica de biochip.

A preparação das amostras seguiu procedimento semelhante ao apresentado no tópico relativo à avaliação da técnica e já apresentada anteriormente.

Um exemplo típico da análise processada por esta técnica pode ser observado na figura 22.



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 22 – Exemplo de análise realizada por biochip

A figura 22 corresponde à imagem que a câmera fotossensível do equipamento capta, sendo que cada quadrado corresponde a um biochip. Na imagem é possível visualizar nove quadrados, correspondendo a nove amostras diferentes integrando um carregador. Dentro de cada biochip é possível destacar treze pontos luminosos. Cada ponto luminoso corresponde a uma área discreta, ou seja, área onde há anticorpos fixados e dirigidos para substâncias específicas.

Da análise dos pontos nos biochips resultaram os valores de Unidade de Luminosidade Relativa (RLU) de cada amostra.

TABELA 26 – RESULTADOS EM RLU PARA BIOCHIP NA URINA

Continua

Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdon	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Crea
U1	2492	2049	1882	4718	12423	12048	4786	3778	2585	6609	844
U2	3260	1644	512	5008	10985	12776	4664	4148	2568	6100	292
U3	2772	1580	2086	4479	11960	12847	4999	46	0	5852	326
U4	3092	1630	2279	4840	10736	12520	5079	25	1889	5740	344
U5	3554	1680	2264	5034	12460	13664	5109	3606	2397	6134	447
U6	2797	1766	2171	4404	11962	12117	4585	4031	2461	3958	269
U7	3688	2422	1807	2210	6446	9575	3843	1641	4000	8827	1130

Continuação

Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdon	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Crea
U8	2786	1986	2241	5103	13509	13968	5215	3628	2648	7502	676
U9	2676	1842	1806	2238	12128	12864	4592	243	304	5401	267
U10	3032	1147	0	2837	11712	13906	5025	4184	2536	6797	475
U11	4074	2196	2877	6138	14654	14876	4627	108	2328	7594	603
U12	3406	1908	2238	5006	11258	12237	4689	95	2139	5890	446
U13	3693	2289	3272	6273	19043	16235	4668	4782	3494	6469	492
U14	3726	2341	3156	6220	17195	15978	5321	4091	3555	7280	989
U15	3490	2276	2978	6211	17430	16177	4721	84	3418	6662	544
U16	3114	1453	2206	5493	18394	14734	4093	3748	3524	6883	256
U17	3896	2263	2918	5986	18210	15405	4992	3645	3105	7439	1398
U18	3298	1995	2357	4783	12029	13416	5143	3235	795	6545	651
U19	2947	1604	2024	4660	13159	12414	4468	632	2685	6868	399
U20	3490	1807	2368	5707	10008	8092	3314	4531	3609	6742	255
U21	3670	2538	3889	7008	21576	17483	4592	5669	3997	7678	1145
U22	3586	2155	3046	6180	18159	16489	5220	4160	3558	7242	588
U23	3466	1727	3096	6067	17537	17400	5081	3338	3613	6824	388
U24	2892	1471	49	1941	6469	8911	3682	3807	2525	6422	376
U25	3514	2146	3058	6278	18322	16444	4993	5231	3540	6977	457
U26	3623	2202	3108	6276	18904	17014	5134	3162	3513	7119	727
U27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U32	3606	1783	3157	6366	18132	17548	5077	3917	3563	5918	456
U33	3510	2518	3282	6457	18144	17963	5250	3827	3447	7943	832
U34	3293	2074	3005	6402	17034	16734	5404	88	3592	7820	503
U35	3632	2364	3329	6884	17414	16791	5368	104	1014	7641	470
U36	3418	1791	2862	5884	15883	15767	4512	27	3490	6347	341
U37	3555	2123	2230	2381	17505	16282	4312	4143	3543	7552	513
U38	4036	2065	2831	5803	17898	15775	4728	3972	3547	7038	632
U39	3524	2214	2921	5701	17659	16621	4170	109	3151	7454	1264
U40	3234	2061	2819	5598	16174	15165	4183	3191	3092	5005	592
U41	2914	1663	2444	4976	12532	13424	4070	52	0	5351	278
U42	4027	2275	3126	6371	16968	15681	4972	4067	3715	7685	963
U43	3887	2131	2976	6386	18987	17149	4868	3985	3802	8660	756
U44	2659	2319	3246	6150	17590	16551	4653	3846	3442	545	1047
U45	3435	2099	3022	6080	17727	16104	4601	3139	3616	6526	318
U46	2908	2159	2794	6384	17906	16435	4663	2968	3443	7480	372
U47	3089	2223	2882	6044	16898	16960	4858	385	1400	7182	700
U48	2981	2195	3024	6293	16778	15941	4956	3660	1942	7302	765
U49	2767	2072	21	3965	12250	12255	5097	4153	2606	6506	672
U50	3462	2187	2721	6083	14497	13430	5483	2194	3060	5901	748
U51	3200	1733	2152	4624	11259	12312	4764	57	2308	6110	698

Conclusão

Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Crea
U52	3148	2053	2950	5319	12873	13755	4648	79	2758	6875	948
U53	2917	1808	2898	5229	13126	13539	4884	7929	2580	5994	256
U54	3202	1920	2084	4767	12881	14272	4665	3948	2828	5813	252
U55	3334	1930	2982	5173	12027	12859	4659	6971	2494	6644	752
U56	3295	1899	2209	5229	11616	12169	5408	85	1559	6520	538
U57	3872	2487	2111	5468	17801	17624	6310	6046	3530	7113	1170
U58	3227	1489	2277	5358	10912	13704	4460	137	2822	5734	298
U59	2629	1938	22	4484	12821	14378	4869	3772	2458	7314	1334
U60	3559	2312	2814	5871	13185	14478	5636	71	104	5902	612
U61	3060	1449	1677	4643	9185	11649	4208	38	2356	5719	232
U62	2729	1832	2863	5151	10463	11512	4195	159	1119	6267	400
U63	4028	2652	1702	6300	14489	15922	5599	100	754	6601	1581
U64	3208	1900	2201	5316	11259	12930	4756	153	21	7194	733
U65	3068	2020	2856	4984	13682	13584	4964	3173	2748	5540	1529
U66	2669	1937	28	755	6856	11400	3711	5100	3288	6597	518
U67	3266	1913	3241	5814	14248	13756	4964	6280	1598	6938	627
U68	3234	2246	2985	5773	14918	15441	5524	0	3026	395	549
U69	3086	1334	1914	4361	4376	1283	1310	41	2652	5517	244
U70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U71	3057	1939	2238	4527	10387	13297	4920	42	2394	6295	763
U72	2781	2374	101	5597	16010	16290	5867	5794	3529	1079	1919
U73	3412	1958	3178	5900	15283	15276	5283	7623	3014	6518	448
U74	2930	1989	2852	5291	12118	12394	4695	100	2692	7255	621
U75	3773	2126	1582	1903	15517	14699	4864	4456	3014	6905	792
U76	3479	1916	2341	4943	13258	14448	4913	239	2475	6930	670
U77	3388	2290	2381	5394	11981	14770	4899	330	2936	6438	567
U78	3501	1936	1837	4320	13638	14110	5052	4520	2659	5723	668

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz1 – benzodiazepínicos; Bdz2 – benzodiazepínicos; Mdona – metadona; Opi – opióides; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetaminas; Crea – creatinina.

TABELA 27 – RESULTADOS EM RLU PARA BIOCHIP NO SANGUE

Continua

Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf
S1	2759	1103	2129	3669	3292	2488	4392	2022	2214	377
S2	3436	1624	2206	3643	3332	2612	4497	182	2116	2143
S3	2530	1069	25	2503	2286	1647	3714	54	2134	2126
S4	4181	24	3846	4380	4540	3245	5725	2691	3368	3347
S5	4162	1762	3829	4469	4017	3237	4723	49	2975	3262
S6	2610	1649	22	1385	2116	2007	4566	2604	2318	1919
S7	3482	1744	2628	3958	4046	3203	4764	115	375	2689
S8	3367	1848	67	3836	3492	2661	4024	2304	2574	2487

Continuação

Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf
S9	3662	1954	2188	2138	4191	3096	4454	2152	36	2490
S10	3677	1479	3056	3884	3694	2625	4351	1940	2789	2822
S11	3429	1453	0	2449	4237	2828	4523	2175	2771	3112
S12	2384	1036	1862	3399	3511	2084	3702	1964	1916	35
S13	3703	1514	3458	3928	4205	3021	4723	2226	3130	3222
S14	3368	1264	2176	3465	3158	2699	4314	34	61	2326
S15	3290	1266	23	1746	3003	2426	3963	2185	2124	2080
S16	2549	1407	2761	3642	3104	2180	3571	2771	1884	2328
S17	2403	1478	2220	3690	2487	2234	4075	2248	2244	2224
S18	3086	1476	1740	3670	3102	2548	4506	1500	2303	2063
S19	3684	1593	2521	2236	4154	3166	4512	2426	2862	3009
S20	3454	1785	3647	4562	4563	3407	4173	1038	3510	3374
S21	3348	1705	3389	4010	3940	2606	4674	2287	2819	2928
S22	2749	1440	3518	4602	3120	2856	4288	3068	3079	931
S23	4374	1728	3791	4345	5208	3723	5321	2780	3547	3485
S24	4373	1748	22	1731	4260	3400	4604	258	3097	3290
S25	3753	1744	3299	4007	4613	3187	4640	3122	3022	3128
S26	4411	1992	4192	4884	5524	3858	5288	3217	3840	3323
S27	2836	1657	2211	3827	3385	2802	4500	124	1336	2600
S28	3491	1465	584	3089	4350	2830	4528	3160	3124	467
S29	2906	1589	2120	3857	3030	2471	4373	68	2232	2372
S30	3482	1932	2375	3810	3668	3070	4588	150	2418	2538
S31	2850	1758	0	3009	3408	2561	4298	2444	2395	2290
S32	4031	1410	22	1474	4468	3228	4633	2100	3185	3356
S33	2865	1286	2269	3598	3053	2314	4396	80	2224	2158
S34	3556	1576	3338	4006	58	3125	4397	3059	3146	3054
S35	4249	2000	3771	4508	4971	3482	5017	268	3378	3347
S36	2479	1285	3104	3645	2940	2598	3860	44	42	2094
S37	3460	1698	2232	3796	3730	3019	4801	81	2628	2236
S38	2369	1060	2586	3243	2496	1828	2886	158	34	1776
S39	4110	1682	3890	4511	4273	3403	5398	126	2937	2925
S40	3175	1750	2392	3955	3472	3034	4569	204	0	2369
S41	2891	0	0	1297	4357	3073	4373	2667	2902	2261
S42	2534	1377	0	1541	3098	2282	4062	2112	2247	955
S43	4326	30	1492	4046	5572	3891	5562	3292	4011	3899
S44	3350	0	3112	3736	4001	2911	4062	2719	2785	2471
S45	3111	1684	2212	3797	3556	2730	4468	70	2224	2036
S46	2833	1438	2142	3608	3733	2838	4706	2302	2292	2257
S47	2167	991	33	1463	2010	1608	2871	1920	1360	1602
S48	1872	1035	23	1407	1954	1851	3041	2511	2322	2419
S49	3687	1597	3122	3895	4086	2800	4347	145	2804	2484
S50	2864	1573	3220	3818	3602	2758	3954	2934	395	2148
S51	1401	688	2384	2876	1415	806	1856	40	797	1262
S52	3141	1636	2124	3846	3367	2647	4207	69	2307	2276

Conclusão										
Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf
S53	3166	1807	2353	3702	3624	2895	4459	0	2350	2304
S54	3227	1181	2419	2944	2059	902	2140	194	2258	2159
S55	1737	1030	2876	3501	2522	1580	3610	3242	1492	1724
S56	1897	962	24	2062	3008	2376	4393	3140	2216	2277
S57	3922	1708	3474	4451	4155	3043	5294	45	3486	358
S58	2488	1840	2437	3870	3849	2883	4709	2286	2488	2377
S59	3382	1891	2503	4229	4030	2815	4827	2302	3095	2691
S60	2090	1028	28	1509	2501	1844	3474	2914	2077	303
S61	2338	1137	0	2102	3934	238	4236	2601	2905	287
S62	3623	1573	3164	3904	3846	2974	4441	37	2244	2855
S63	1972	1358	1798	3189	3898	2524	3623	2086	1534	785
S64	3208	24	2334	3717	3208	2632	4157	2638	2336	2221
S65	3573	1408	3171	3659	4059	2830	4070	2565	2802	2396
S66	3901	1584	32	2500	3093	2724	4361	2318	3308	3244
S67	3861	0	3435	4104	4870	3266	4863	2834	3571	3148
S68	2480	1508	3174	3219	3903	2978	4189	101	3186	2857
S69	3166	1559	3009	4026	3845	2941	4300	912	275	2515
S70	3032	1779	2242	3830	3876	3057	4266	121	1635	2340
S71	504	0	1629	3199	3782	2207	3753	2420	2423	24
S72	2919	1560	591	571	3274	2580	4269	1194	2231	1970
S73	4218	0	40	4174	4905	3374	5189	442	2858	3300
S74	2723	1677	2302	3662	3345	2699	4071	2405	2622	2357
S75	3844	1618	3497	3896	4403	3292	4533	2608	3125	2840
S76	3380	1954	2283	3737	4025	2909	4808	79	2470	2536

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz1 – benzodiazepínicos; Bdz2 – benzodiazepínicos; Mdona – metadona; Opi – opióides; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetaminas.

Como o princípio do método (imunoensaio com quimioluminescência) contempla a emissão ou não de luz como resultado final da análise, os valores resultantes do processo analítico são expressos em unidades de luminosidade.

De forma mais específica, se o agente tóxico ou metabólito procurado estiver presente na matriz analisada, ele se ligará ao anticorpo fixado no biochip e não permitirá a ligação do conjugado, capaz de gerar luz, ao mesmo anticorpo.

Dessa forma, uma amostra positiva para o agente tóxico de interesse vai gerar um resultado com um baixo valor numérico de luminosidade, pois o conjugado – responsável pela resposta luminosa – não se ligará ao biochip e será eliminado na etapa de lavagem.

A expressão do resultado em unidade relativa de luminosidade necessita ser comparada com uma escala analítica conhecida. Assim, os valores de luminosidade comparados com os valores das curvas de calibração, resultam em unidade de concentração.

TABELA 28 – RESULTADOS CONVERTIDOS PARA CONCENTRAÇÃO NA URINA

Continua

Amostra	Manf ng/mL	Barb ng/mL	Bdz1 ng/mL	Bdz2 ng/mL	Mdon ng/mL	Opi ng/mL	Fenc ng/mL	Coca ng/mL	Thc ng/mL	Anf ng/mL	Crea mg/dL
U1	299.40	19.67	26.32	20.73	3.03	24.87	<1.90	22.60	5.11	25.46	79.18
U2	146.30	50.76	234.30	16.45	5.16	19.84	<1.90	17.13	5.26	37.66	343.30
U3	238.40	56.98	19.79	24.68	3.63	19.38	<1.90	>697.00	>156.00	43.74	301.70
U4	176.60	52.08	14.83	18.86	5.62	21.55	<1.90	>697.00	12.17	46.55	282.90
U5	<125.00	47.46	15.18	16.09	2.98	14.43	<1.90	25.40	6.83	36.84	204.40
U6	233.30	40.07	17.48	26.01	3.63	24.37	<1.90	18.79	6.24	101.40	377.30
U7	<125.00	<9.40	29.14	106.40	22.21	47.56	5.46	87.60	<3.60	<8.10	42.78
U8	235.50	23.78	15.73	15.16	1.87	12.72	<1.90	25.03	4.54	<8.10	114.50
U9	258.40	34.05	29.18	104.40	3.40	19.28	<1.90	547.60	84.29	55.33	380.50
U10	187.70	115.70	>735.00	70.48	3.98	13.07	<1.90	16.64	5.55	20.91	188.80
U11	<125.00	10.84	4.34	3.83	0.96	8.05	<1.90	>697.00	7.48	<8.10	135.90
U12	<125.00	29.18	15.80	16.48	4.69	23.51	<1.90	>697.00	9.37	42.80	205.00
U13	<125.00	<9.40	0.21	2.65	<0.60	1.98	<1.90	9.04	<3.60	28.81	180.20
U14	<125.00	<9.40	1.21	3.11	<0.60	3.06	<1.90	17.93	<3.60	8.08	58.17
U15	<125.00	<9.40	3.10	3.18	<0.60	2.22	<1.90	>697.00	<3.60	24.18	157.20
U16	172.50	70.80	16.59	10.36	<0.60	8.74	3.84	23.07	<3.60	18.78	399.20
U17	<125.00	<9.40	3.82	5.23	<0.60	5.57	<1.90	24.75	<3.60	<8.10	21.87
U18	139.60	23.18	13.09	19.72	3.53	15.87	<1.90	32.21	36.52	26.99	121.30
U19	203.80	54.59	21.62	21.65	2.20	22.27	<1.90	233.40	4.21	19.16	236.00
U20	<125.00	36.77	12.85	8.01	7.15	67.73	9.75	12.10	<3.60	22.25	401.00
U21	<125.00	<9.40	<0.60	<1.10	<0.60	<0.80	<1.90	<2.30	<3.60	<8.10	41.36
U22	<125.00	13.21	2.33	3.46	<0.60	0.95	<1.90	16.97	<3.60	9.22	140.90
U23	<125.00	43.34	1.80	4.47	<0.60	<0.80	<1.90	30.20	<3.60	20.24	244.30
U24	214.40	68.71	>735.00	129.10	22.04	55.77	6.63	22.14	5.65	29.93	254.00
U25	<125.00	13.74	2.20	2.61	<0.60	1.13	<1.90	3.74	<3.60	16.41	198.60
U26	<125.00	10.50	1.68	2.63	<0.60	<0.80	<1.90	33.69	<3.60	12.69	102.10
U27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U32	<125.00	38.68	1.20	1.87	<0.60	<0.80	<1.90	20.46	<3.60	42.11	199.20
U33	<125.00	<9.40	0.13	1.14	<0.60	<0.80	<1.90	21.83	<3.60	<8.10	81.24
U34	140.40	18.10	2.79	1.58	<0.60	<0.80	<1.90	>697.00	<3.60	<8.10	175.00

Continuação

Amostra	Manf ng/mL	Barb ng/mL	Bdz1 ng/mL	Bdz2 ng/mL	Mdona ng/mL	Opi ng/mL	Fenc ng/mL	Coca ng/mL	Thc ng/mL	Anf ng/mL	Crea mg/dL
U35	<125.00	<9.40	<0.60	<1.10	<0.60	<0.80	<1.90	>697.00	28.47	<8.10	191.50
U36	<125.00	38.04	4.54	6.21	<0.60	3.96	<1.90	>697.00	<3.60	31.73	285.90
U37	<125.00	15.11	15.99	94.69	<0.60	1.79	2.58	17.20	<3.60	<8.10	170.40
U38	<125.00	18.67	4.95	7.02	<0.60	3.93	<1.90	19.65	<3.60	14.84	126.80
U39	<125.00	9.82	3.79	8.08	<0.60	<0.80	3.38	>697.00	<3.60	<8.10	31.26
U40	150.90	18.92	5.12	9.18	<0.60	6.67	3.30	33.10	<3.60	66.31	139.50
U41	210.10	49.00	11.30	16.90	2.89	15.82	3.98	>697.00	>156.00	56.66	363.30
U42	<125.00	<9.40	1.50	1.83	<0.60	4.34	<1.90	18.27	<3.60	<8.10	61.48
U43	<125.00	14.63	3.12	1.71	<0.60	<0.80	<1.90	19.45	<3.60	<8.10	95.77
U44	262.10	<9.40	0.41	3.72	<0.60	<0.80	<1.90	21.54	<3.60	691.20	51.35
U45	<125.00	16.56	2.60	4.35	<0.60	2.53	<1.90	34.17	<3.60	27.45	310.70
U46	211.30	12.98	5.46	1.73	<0.60	1.17	<1.90	37.92	<3.60	<8.10	257.30
U47	177.10	9.31	4.28	4.69	<0.60	<0.80	<1.90	366.10	19.40	10.95	108.50
U48	197.30	10.90	2.57	2.48	<0.60	3.21	<1.90	24.50	11.54	<8.10	93.91
U49	239.40	18.23	>735.00	34.85	3.24	23.38	<1.90	17.06	4.92	27.93	115.60
U50	<125.00	11.35	6.52	4.33	1.07	15.79	<1.90	60.65	<3.60	42.53	97.47
U51	157.00	42.83	17.98	22.23	4.69	22.98	<1.90	>697.00	7.68	37.42	108.90
U52	166.30	19.42	3.43	12.41	2.51	13.91	<1.90	>697.00	3.55	18.98	63.47
U53	209.50	36.69	4.07	13.53	2.24	15.15	<1.90	<2.30	5.15	40.24	399.20
U54	156.60	28.32	19.85	19.97	2.50	11.09	<1.90	20.00	<3.60	44.72	406.40
U55	133.20	27.62	3.05	14.24	3.54	19.31	<1.90	<2.30	5.93	24.62	96.62
U56	140.10	29.82	16.51	13.53	4.13	24.00	<1.90	>697.00	16.70	27.59	159.70
U57	<125.00	<9.40	19.09	10.64	<0.60	<0.80	<1.90	<2.30	<3.60	12.85	39.08
U58	152.10	66.66	14.87	11.94	5.29	14.20	<1.90	>697.00	<3.60	46.70	335.30
U59	268.60	27.06	>735.00	24.59	2.56	10.54	<1.90	22.69	6.26	<8.10	26.13
U60	<125.00	<9.40	5.19	6.34	2.18	10.03	<1.90	>697.00	>156.00	42.51	133.00
U61	182.50	71.27	34.71	21.92	9.30	27.89	3.16	>697.00	7.22	47.08	446.00
U62	247.30	34.82	4.53	14.53	6.16	28.97	3.23	>697.00	25.53	33.64	235.30
U63	<125.00	<9.40	33.57	2.42	1.07	3.29	<1.90	>697.00	38.44	25.65	11.49
U64	155.50	29.75	16.71	12.45	4.69	18.85	<1.90	>697.00	>156.00	10.61	100.80
U65	181.00	21.54	4.62	16.79	1.71	14.89	<1.90	33.47	3.64	51.67	14.20
U66	259.90	27.13	>735.00	426.20	19.41	29.88	6.41	5.29	<3.60	25.75	168.20
U67	145.20	28.82	0.45	6.91	1.25	13.90	<1.90	<2.30	16.10	17.40	128.30
U68	150.90	<9.40	3.02	7.33	0.79	5.40	<1.90	>697.00	<3.60	885.50	155.20
U69	177.70	85.97	25.19	26.79	46.99	747.60	58.79	>697.00	4.51	52.27	421.40
U70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U71	183.00	26.99	15.80	23.85	6.32	16.58	<1.90	>697.00	6.86	32.97	94.32
U72	236.60	<9.40	>735.00	9.19	<0.60	1.76	<1.90	<2.30	<3.60	398.60	<3.60
U73	<125.00	25.67	1.00	6.06	0.58	6.16	<1.90	<2.30	<3.60	27.64	203.80
U74	207.00	23.58	4.67	12.75	3.41	22.41	<1.90	>697.00	4.15	8.84	130.10
U75	<125.00	14.93	39.42	132.80	0.46	8.92	<1.90	13.05	<3.60	18.23	88.55
U76	<125.00	28.61	13.43	17.36	2.11	10.18	<1.90	555.50	6.11	17.61	116.10
U77	<125.00	<9.40	12.58	11.51	3.60	8.57	<1.90	419.50	<3.60	29.55	148.40

Conclusão

Amostra	Manf ng/mL	Barb ng/mL	Bdz1 ng/mL	Bdz2 ng/mL	Mdon ng/mL	Opi ng/mL	Fenc ng/mL	Coca ng/mL	Thc ng/mL	Anf ng/mL	Crea mg/dL
U8	<125.00	27.20	27.98	27.56	1.75	11.96	<1.90	12.24	4.44	46.98	116.60

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz1 – benzodiazepínicos; Bdz2 – benzodiazepínicos; Mdon – metadona; Opi – opióides; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetaminas; Crea – creatinina.

TABELA 29 – RESULTADOS CONVERTIDOS PARA CONCENTRAÇÃO NO SANGUE

Continua

Amostra	Manf ng/mL	Barb ng/mL	Bdz1 ng/mL	Bdz2 ng/mL	Mdon ng/mL	Opi ng/mL	Fenc ng/mL	Coca ng/mL	Thc ng/mL	Anf ng/mL
S1	43.17	8.80	1.18	0.16	1.56	1.35	0.33	28.43	5.23	78.62
S2	22.60	1.71	1.05	0.18	1.49	1.06	0.26	>320.00	5.65	5.95
S3	51.92	9.56	>220.00	1.60	4.58	5.20	0.83	>320.00	5.57	6.09
S4	4.59	>220.00	(-) 0	(-) 0	0.08	0.13	(-) 0	(-) 0	0.21	(-) 0
S5	5.05	0.71	(-) 0	(-) 0	0.52	0.14	0.12	>320.00	2.29	(-) 0
S6	48.73	1.51	>220.00	8.82	5.44	3.01	0.22	1.71	4.80	8.05
S7	21.40	0.83	0.48	0.05	0.49	0.17	0.10	>320.00	27.41	2.09
S8	24.43	0.23	203.10	0.09	1.21	0.96	0.59	12.77	3.81	3.36
S9	16.88	(-) 0	1.08	2.76	0.35	0.28	0.29	20.50	>48.00	3.34
S10	16.52	3.06	0.11	0.08	0.91	1.03	0.36	34.17	3.00	1.31
S11	22.78	3.34	>220.00	1.74	0.31	0.65	0.25	19.23	3.07	(-) 0
S12	58.19	10.36	1.76	0.33	1.18	2.67	0.83	32.43	6.56	>104.00
S13	15.89	2.70	(-) 0	0.06	0.34	0.37	0.12	16.55	1.65	(-) 0
S14	24.41	5.84	1.10	0.28	1.83	0.88	0.38	>320.00	>48.00	4.49
S15	26.53	5.81	>220.00	4.96	2.17	1.51	0.63	18.69	5.61	6.50
S16	51.15	3.87	0.35	0.18	1.94	2.30	0.95	(-) 0	6.71	4.48
S17	57.34	3.07	1.03	0.15	3.73	2.10	0.55	15.44	5.10	5.28
S18	32.43	3.09	2.09	0.16	1.95	1.20	0.26	78.95	4.86	6.65
S19	16.35	1.97	0.60	2.39	0.38	0.20	0.26	7.63	2.73	0.27
S20	22.13	0.57	(-) 0	(-) 0	0.07	0.02	0.48	177.10	(-) 0	(-) 0
S21	24.95	1.09	(-) 0	0.04	0.61	1.07	0.15	13.56	2.89	0.72
S22	43.53	3.49	(-) 0	(-) 0	1.91	0.60	0.40	(-) 0	1.87	27.75
S23	(-) 0	0.93	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0
S24	(-) 0	0.80	>220.00	5.07	0.29	0.02	0.20	>320.00	1.79	(-) 0
S25	14.68	0.83	(-) 0	0.04	0.04	0.18	0.17	(-) 0	2.10	(-) 0
S26	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0
S27	40.47	1.44	1.04	0.10	1.39	0.69	0.26	>320.00	10.01	2.63
S28	21.17	3.21	13.91	0.61	0.21	0.65	0.25	(-) 0	1.68	62.62
S29	38.12	2.00	1.20	0.09	2.11	1.39	0.34	>320.00	5.15	4.15
S30	21.40	(-) 0	0.79	0.10	0.95	0.31	0.21	>320.00	4.41	3.02
S31	40.00	0.74	>220.00	0.71	1.35	1.17	0.39	6.94	4.50	4.76

Continuação

Amostra	Manf ng/mL	Barb ng/mL	Bdz1 ng/mL	Bdz2 ng/mL	Mdon ng/mL	Opi ng/mL	Fenc ng/mL	Coca ng/mL	Thc ng/mL	Anf ng/mL
S32	8.14	3.84	>220.00	7.61	0.13	0.14	0.18	23.51	1.40	(-) 0
S33	39.49	5.50	0.95	0.20	2.06	1.84	0.33	>320.00	5.19	5.82
S34	19.52	2.12	(-) 0	0.04	>132.00	0.25	0.33	(-) 0	1.58	(-) 0
S35	2.89	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	>320.00	(-) 0	(-) 0
S36	54.04	5.52	0.08	0.18	2.33	1.09	0.71	>320.00	>48.00	6.37
S37	21.97	1.14	1.01	0.11	0.86	0.37	0.07	>320.00	3.60	5.18
S38	58.87	9.78	0.53	0.46	3.70	3.96	1.66	>320.00	>48.00	9.64
S39	6.29	1.26	(-) 0	(-) 0	0.28	0.02	(-) 0	>320.00	2.44	0.74
S40	29.80	0.79	0.77	0.06	1.25	0.35	0.22	>320.00	>48.00	4.18
S41	38.62	>220.00	>220.00	10.26	0.21	0.30	0.34	0.18	2.57	4.98
S42	51.76	4.24	>220.00	6.83	1.96	1.94	0.56	22.80	5.09	26.83
S43	0.71	>220.00	2.96	0.03	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0	(-) 0
S44	24.89	>220.00	0.08	0.13	0.54	0.52	0.56	(-) 0	3.02	3.46
S45	31.68	1.24	1.04	0.11	1.11	0.82	0.28	>320.00	5.19	6.90
S46	40.58	3.51	1.16	0.20	0.86	0.63	0.13	12.87	4.91	5.02
S47	68.77	11.54	>220.00	7.75	6.07	5.51	1.68	35.67	9.83	11.91
S48	86.37	10.38	>220.00	8.50	6.43	3.82	1.48	4.56	4.79	3.82
S49	16.27	1.93	0.07	0.07	0.45	0.70	0.36	>320.00	2.94	3.38
S50	39.52	2.14	0.02	0.10	1.04	0.77	0.64	(-) 0	26.45	5.90
S51	127.20	24.21	0.78	0.89	11.69	21.52	3.59	>320.00	15.80	17.97
S52	30.79	1.61	1.19	0.09	1.42	0.99	0.46	>320.00	4.85	4.87
S53	30.06	0.44	0.82	0.15	1.01	0.54	0.29	>320.00	4.68	4.65
S54	28.30	7.25	0.73	0.79	5.77	17.73	2.89	>320.00	5.05	5.81
S55	96.09	10.51	0.25	0.26	3.60	5.75	0.91	(-) 0	8.92	10.27
S56	84.70	12.37	>220.00	3.09	2.16	1.65	0.33	(-) 0	5.22	4.86
S57	10.69	1.07	(-) 0	(-) 0	0.38	0.34	(-) 0	>320.00	(-) 0	82.98
S58	53.66	0.27	0.71	0.08	0.71	0.56	0.13	13.61	4.14	4.12
S59	24.03	(-) 0	0.62	0.00	0.51	0.67	0.06	12.87	1.80	2.07
S60	72.96	10.56	>220.00	7.19	3.68	3.86	1.03	(-) 0	5.82	98.50
S61	60.30	8.09	>220.00	2.91	0.61	>116.00	0.44	1.79	2.56	>104.00
S62	17.84	2.14	0.05	0.07	0.72	0.43	0.30	>320.00	5.10	1.13
S63	79.91	4.49	1.92	0.51	0.65	1.26	0.90	24.36	8.65	34.49
S64	28.84	>220.00	0.85	0.14	1.73	1.02	0.49	0.83	4.73	5.30
S65	19.09	3.86	0.04	0.17	0.48	0.65	0.55	2.83	2.95	3.98
S66	11.18	2.05	>220.00	1.61	1.97	0.83	0.35	12.14	0.73	(-) 0
S67	12.12	>220.00	(-) 0	0.02	(-) 0	0.11	0.03	(-) 0	(-) 0	(-) 0
S68	2.41	0	0	0	0	0	0	>320.00	0	0
S69	30.06	2.27	0.15	0.04	0.72	0.48	0.39	224.00	33.77	3.17
S70	34.09	0.61	0.99	0.10	0.68	0.32	0.42	>320.00	8.04	4.39
S71	372.10	>220.00	2.44	0.50	0.80	2.20	0.79	7.86	4.39	>104.00
S72	37.69	2.26	13.68	53.02	1.60	1.13	0.41	134.20	5.16	7.53
S73	3.67	>220.00	>220.00	0.01	(-) 0	0.03	(-) 0	>320.00	2.74	(-) 0
S74	44.47	1.29	0.90	0.17	1.46	0.88	0.55	8.45	3.63	4.26

										Conclusão
Amostra	Manf ng/mL	Barb ng/mL	Bdz1 ng/mL	Bdz2 ng/mL	Mdoná ng/mL	Opi ng/mL	Fenc ng/mL	Coca ng/mL	Thc ng/mL	Anf ng/mL
S75	12.52	1.76	(-) 0	0.07	0.17	0.09	0.24	1.60	1.67	1.21
S76	24.08	(-) 0	0.93	0.13	0.51	0.52	0.07	>320.00	4.21	3.03

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz1 – benzodiazepínicos; Bdz2 – benzodiazepínicos; Mdoná – metadona; Opi – opióides; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetaminas.

Para a decisão do que deve ser considerado como positivo ou negativo, é necessária a comparação da concentração encontrada do analito com os valores de *cut off* estipulados para cada substância, quais sejam:

- Metanfetamina: 300 ng/mL na urina; 50 ng/mL no sangue;
- Barbitúricos: 200 ng/mL na urina; 50 ng/mL no sangue;
- Benzodiazepínicos I: 200 ng/mL na urina; 50 ng/mL no sangue;
- Benzodiazepínicos II: 200 ng/mL na urina; 50 ng/mL no sangue;
- Metadona: 300 ng/mL na urina; 25 ng/mL no sangue;
- Opiáceos: 300 ng/mL na urina; 25 ng/mL no sangue;
- Fenciclidina: 25 ng/mL na urina; 05 ng/mL no sangue;
- Cocaína: 300 ng/mL na urina; 50 ng/mL no sangue;
- THC: 50 ng/mL na urina; 10 ng/mL no sangue;
- Anfetamina: 300 ng/mL na urina; 25 ng/mL no sangue;
- Creatinina: deve ser inferior a 663 ng/mL na urina;

A aplicação dos valores de *cut off* sobre os valores convertidos em concentração plasmática e urinária dos analitos de interesse, gera uma nova matriz de resultados determinando quais são os analitos considerados como detectados (positivo) ou não detectados (negativo) em cada amostra analisada, culminando na análise qualitativa final do procedimento técnico aplicado.

TABELA 30 – RESULTADO FINAL PARA BIOCHIP NA URINA

											Continua
Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdoná	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Crea
U1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U2	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P
U3	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P

Continuação

Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Crea
U4	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U5	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U9	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P
U10	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P
U11	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U12	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U15	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U20	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U23	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U24	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P
U25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U26	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
U28	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
U29	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
U30	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
U31	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
U32	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U33	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U34	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U35	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U36	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U37	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U38	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U39	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U40	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U41	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P
U42	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U43	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U44	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P
U45	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U46	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U47	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U48	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U49	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P
U50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U51	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P

Conclusão											
Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdon	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Crea
U52	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U53	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U54	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U55	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U56	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U57	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U58	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U59	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P
U60	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P
U61	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U62	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U63	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U64	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	P
U65	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U66	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	P
U67	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U68	N	N	N	N	N	N	N	P	N	P	P
U69	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P
U70	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
U71	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U72	N	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P
U73	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U74	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U75	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P
U76	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U77	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P
U78	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz1 – benzodiazepínicos; Bdz2 – benzodiazepínicos; Mdon – metadona; Opi – opióides; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetaminas; Crea – creatinina.

TABELA 31 – RESULTADO FINAL PARA BIOCHIP NO SANGUE

Continua											
Amostra	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdon	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	
S1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
S2	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S3	P	N	P	N	N	N	N	P	N	N	
S4	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	
S5	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S6	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	
S7	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	
S8	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	
S9	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	
S10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S11	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	

Amostra	Conclusão									
	Manf	Barb	Bdz1	Bdz2	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf
S60	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P
S61	P	N	P	N	N	P	N	N	N	P
S62	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N
S63	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P
S64	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
S65	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S66	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N
S67	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
S68	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N
S69	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N
S70	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N
S71	P	P	N	N	N	N	N	N	N	P
S72	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N
S73	N	P	P	N	N	N	N	P	N	N
S74	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S75	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
S76	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz1 – benzodiazepínicos; Bdz2 – benzodiazepínicos; Mdona – metadona; Opi – opióides; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetaminas.

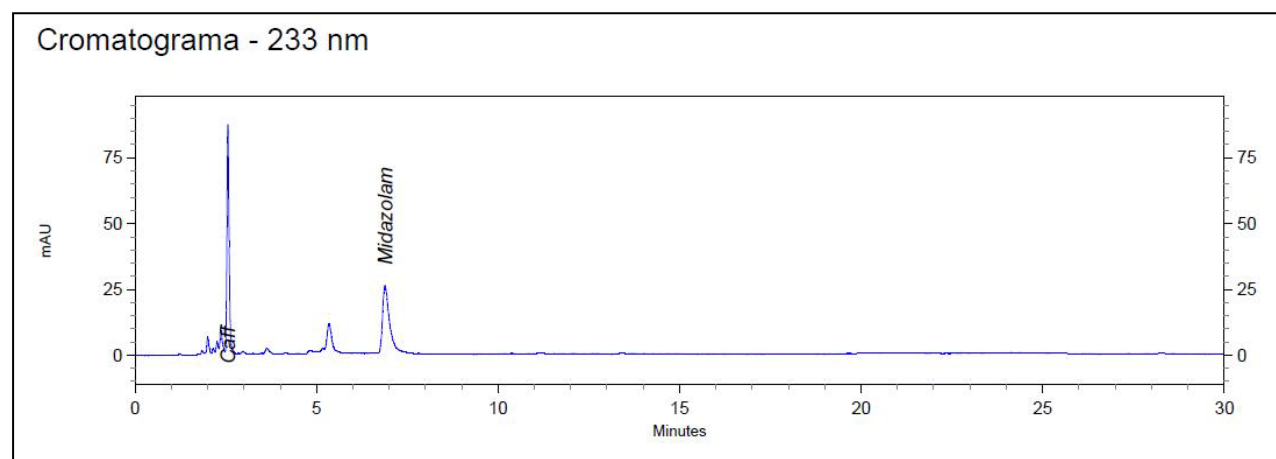
5.3.2 Análise através de CLAE-DAD

As amostras elencadas para o estudo, sangue e urina provenientes de cadáveres necropsiados, foram submetidas à análise cromatográfica.

Cada amostra de sangue ou de urina gera dois extratos e, por conseguinte, duas corridas cromatográficas. Para a análise do resultado referente a uma amostra é necessário avaliar o cromatograma e os espectros da corrida correspondente ao extrato ácido e da corrida correspondente ao extrato básico.

Além dos extratos ácidos e básicos, para as amostras que possuem indício de conterem benzodiazepínicos, anfetaminas ou opióides, mais um extrato é acrescentado para cada um desses grupos de substâncias.

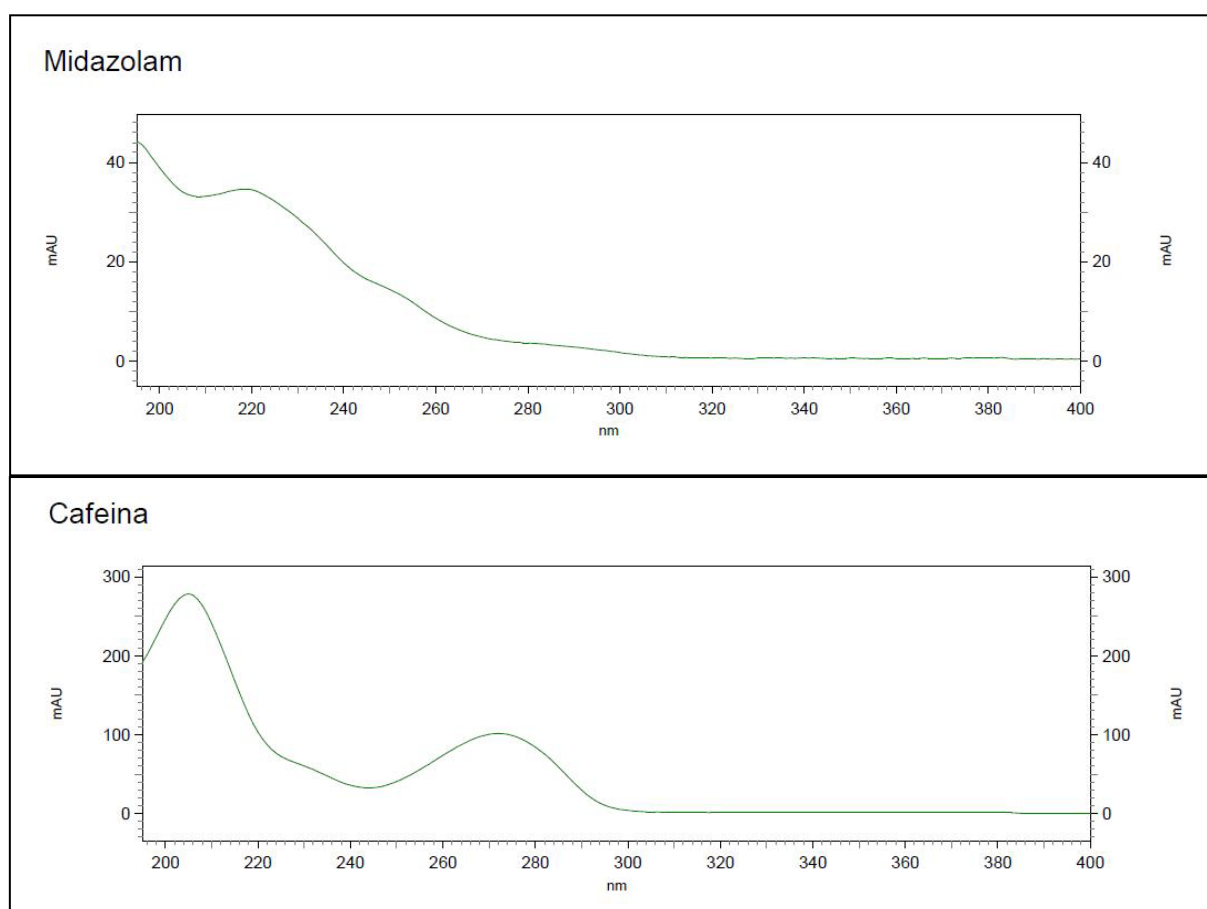
A figura 23 exemplifica um cromatograma típico de uma amostra, obtido através da análise por CLAE-DAD, e a figura 24 os espectros DAD dos picos significantes observados no cromatograma.



FONTE: O autor (2013)

NOTE: Caff - cafeína

FIGURA 23 – Cromatograma de amostra obtido por CLAE-DAD



FONTE: O autor (2013)

FIGURA 24 – Espectros DAD do Midazolam e Cafeína detectados por CLAE-DAD

Conclusão

Amostra	Manf	Barb	Bdz	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Outros
S11	N	N	N	N	N	N	N	N	N	ALDICARB
S12	N	N	N	N	N	N	N	N	P	
S13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S15	N	N	P	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S16	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S17	N	N	N	N	N	N	N	N	N	AMITRIPTILINA
S18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	DIPIRONA
S19	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S20	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	ALDICARB
S22	N	N	N	N	N	N	N	N	N	AMITRIPTILINA
S23	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S24	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S25	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S26	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S27	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S28	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S29	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S30	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S31	N	N	P	N	N	N	N	N	N	
S32	N	N	P	N	N	N	N	N	N	FLUOXETINA
S33	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S34	N	N	N	P	N	N	N	N	N	
S35	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S36	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S37	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S38	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S39	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S40	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S41	N	P	N	N	N	N	N	N	N	
S42	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S43	N	P	N	N	N	N	N	N	N	
S44	N	P	N	N	N	N	N	N	N	
S45	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S46	N	N	N	N	N	N	N	N	N	ALDICARB
S47	N	N	P	N	N	N	N	N	N	AMITRIPTILINA
S48	N	N	P	N	N	N	N	N	N	CITALOPRAM
S49	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S51	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S52	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S53	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S54	N	N	N	N	P	N	P	N	N	
S55	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S56	N	N	P	N	N	N	N	N	N	DIPIRONA, FENITOINA
S57	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S58	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S59	N	N	N	N	N	N	N	N	N	ALDICARB
S60	N	N	P	N	N	N	N	N	N	DIPIRONA
S61	N	N	P	N	N	N	N	N	P	DIPIRONA
S62	N	N	N	N	N	N	P	N	N	

										Conclusão
Amostra	Manf	Barb	Bdz	Mdona	Opi	Fenc	Coca	Thc	Anf	Outros
S63	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S64	N	P	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S65	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S66	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CLORPROMAZINA, PROMETAZINA, HALOPERIDOL
S67	N	P	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S68	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S69	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
S70	N	N	N	N	N	N	P	N	N	
S71	N	P	N	N	N	N	N	N	P	DIPIRONA, CARBAMAZEPINA
S72	N	N	N	N	N	N	N	N	N	FLUOXETINA
S73	N	P	P	N	N	N	N	N	N	FENITOINA
S74	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S75	N	N	N	N	N	N	N	N	N	CARBAMAZEPINA
S76	N	N	N	N	N	N	P	N	N	

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Manf – metanfetamina; Barb – barbitúrico; Bdz – benzodiazepínicos; Mdona – metadona; Opi – opióide; Fenc – fenciclidina; Coca – cocaína; Thc – canabinóides; Anf – anfetamina.

5.4 ANÁLISE COMPARATIVA

5.4.1 Matriz Urina

Ao analisar a tabela 30, pode-se perceber que para a técnica de biochip foram testadas 78 urinas. Dessas, 44 obtiveram resultado negativo.

Nesse particular, vale destacar que as amostras U27, U28, U29, U30, U31 e U70 foram consideradas negativas, porém, na realidade, são amostras que não apresentaram nível de creatinina suficiente para serem consideradas como urina pelo equipamento. Para justificar tal fenômeno, podem ser aventadas duas hipóteses. A primeira de que um erro aleatório aconteceu no próprio biochip, ou na técnica, o que pode ser inferido pelo fato dessa anomalia ter acontecido com quatro amostras justamente sequenciais. A segunda hipótese refere-se à própria natureza da matriz. Em algumas situações *postmortem*, há ruptura de órgãos ocultos, como bexiga, e o conteúdo desses órgãos misturam-se a outros fluidos biológicos extravazados. Essa mistura é coletada e tratada como sendo a matriz original pura, o que pode ter sido o caso da amostra U70, mas em realidade pode não tratar-se exatamente da matriz urina e ter sido rotulada como tal.

Para as demais amostras, positivas para alguma substância ou classe de substância, pode-se analisar que não houve resultado positivo para metanfetaminas, barbitúricos e metadona.

Já para benzodiazepínicos houve sete amostras positivas. Para opióides uma, uma para fenciclidina, cinco para THC ou canabinóides, três para anfetamina e, o principal, vinte e sete amostras de urina positivas para cocaína pela técnica do biochip.

Se somadas as amostras positivas e as negativas, extrapola-se o total de 78 amostras. Isso se deve pelo fato de nove amostras ter apontado resultado positivo para mais de uma substância simultaneamente, dados esses sumarizados na tabela 34.

TABELA 34 – RESUMO DAS URINAS POR BIOCHIP

Amostras	Quantidade	Porcentagem
Total	78	100%
Negativas	44	56,4%
Positivas para:		
Metanfetamina	0	0%
Barbitúricos	0	0%
Benzodiazepínicos	7	9%
Metadona	0	0%
Opióides	1	1,3%
Fenciclidina	1	1,3%
Cocaína	27	34,6%
THC	5	6,4%
Anfetamina	3	3,8%
Mais de uma substância	9	11,5%

FONTE: O autor (2013)

Da tabela 34 pode-se extrair que a maioria das urinas analisadas por biochip, 56,4%, resultaram em negativo para as substâncias de interesse do estudo. Das positivas, a substância mais presente nas amostras de urina foi a cocaína, em 34,6% das amostras, seguida, de longe, pelos benzodiazepínicos, em 9% das amostras.

Ao visualizar os dados da tabela 32, pode-se constatar que também foram analisadas as 78 amostras de urina pela técnica de CLAE-DAD.

Nesta técnica, 50 amostras resultaram negativas para as substâncias de interesse do estudo.

Ainda na CLAE-DAD, é possível analisar que não houve amostra positiva para metanfetamina, barbitúricos, metadona e fenciclidina.

Para as positivas, a técnica cromatográfica sugeriu uma amostra positiva para opióides, uma para anfetaminas, quatro para benzodiazepínicos e vinte e duas positivas para cocaína.

Para essa técnica não houve amostra que acusou resultado positivo para mais de uma substância de interesse simultaneamente e, como já discutido no tópico de avaliação, não houve condição cromatográfica para detecção de THC. Esses dados estão sumarizados na tabela 35.

TABELA 35 – RESUMO DAS URINAS POR CLAE-DAD

Amostras	Quantidade	Porcentagem
Total	78	100%
Negativas	50	64,1%
Positivas para:		
Metanfetamina	0	0%
Barbitúricos	0	0%
Benzodiazepínicos	4	5,1%
Metadona	0	0%
Opióides	1	1,3%
Fenciclidina	0	0%
Cocaína	22	28,2%
THC	*	*
Anfetamina	1	1,3%
Mais de uma substância	0	0%

FONTE: O autor (2013)

NOTA: * - não pode ser avaliado

Ao analisar a tabela 35, percebe-se que a maioria das urinas analisadas por CLAE-DAD resultaram negativas para as substâncias de interesse, totalizando 64,1% das amostras.

Nas amostras positivas, a substância mais presente foi a cocaína, em 28,2% das urinas analisadas.

Qualitativamente, os resultados apresentados pela técnica de biochip e pela CLAE-DAD concordam ao apontar que a maioria das urinas eram negativas para as substâncias pesquisadas e que, nas positivas, a substância mais detectada foi a cocaína.

De forma quantitativa, apresenta-se a tabela 36.

TABELA 36 – COMPARATIVO PARA URINA

Amostras	Biochip	CLAE-DAD	Discordância
Negativas	56,4%	64,1%	7,7%
Positivas para:			
Metanfetamina	0%	0%	0%
Barbitúricos	0%	0%	0%
Benzodiazepínicos	9%	5,1%	3,9%
Metadona	0%	0%	0%
Opióides	1,3%	1,3%	0%
Fenciclidina	1,3%	0%	1,3%
Cocaína	34,6%	28,2%	6,4%
THC	6,4%	*	6,4%*
Anfetamina	3,8%	1,3%	2,5%

FONTE: O autor (2013)

NOTA: * - não pode ser avaliado

Na tabela comparativa, fica possível destacar que a maior discordância entre as técnicas foi em relação ao montante de urinas negativas, resultando em uma diferença de 7,7% nos resultados. A técnica cromatográfica foi a que obteve o maior índice de amostras negativas, o que seria esperado, uma vez que técnicas de triagem baseadas em imunoensaio, caso do biochip, em geral tendem a resultados falso positivo mais frequentes.

Em relação às amostras positivas para algum analito, as discordâncias entre as duas técnicas não chegaram a 10%, ou seja, pode-se dizer que houve boa concordância entre as técnicas testadas, para a matriz urina. Levando-se em consideração apenas esse dado, é um índice de concordância satisfatório e que aponta para uma boa qualidade analítica de ambas as técnicas para esses casos.

Porém, mesmo ao atingir um bom patamar de concordância, é preciso um olhar mais crítico sobre os resultados quando considerados os valores nominais de amostras positivas. Ao analisar as tabelas 34, 35 e 36, é preciso considerar que para algumas substâncias, como anfetamina, fenciclidina e benzodiazepínicos, a variação, apesar de pequena em porcentagem, foi calculada entre valores distantes. Esse tipo de diferença é importante e deve ser analisada mais profundamente, pois apesar da pequena diferença em relação ao todo, na realidade uma técnica pode estar detectando essas substâncias e a outra estar com dificuldades.

Como já discutido, técnicas de imunoensaio tendem a uma maior prevalência de resultados falso positivo, mas isso não isenta a técnica cromatográfica de estar

acusando resultado falso negativo. Para uma decisão mais acertada de onde encontra-se o resultado equivocado, é necessário o uso da técnica confirmatória e comparação dos resultados com esta.

5.4.2 Matriz Sangue Total

Pela observação da tabela 31, pode-se notar que para a técnica de biochip foram testadas 76 amostras de sangue total. Dessas amostras, 13 resultaram em negativo para as substâncias de interesse.

Nas demais amostras, positivas para alguma substância, é possível visualizar que não houve resultado positivo apenas para fenciclidina.

Houve dezessete amostras positivas para metanfetamina, oito para barbitúricos, dezoito para benzodiazepínicos, uma para metadona, uma para opióides, trinta e duas para cocaína, dez para THC e dez para anfetamina.

Se somadas as amostras positivas e as negativas, o resultado ultrapassa as 76 amostras. Isso se deve pelo fato de vinte e oito amostras ter acusado resultado positivo para mais de uma substância ao mesmo tempo, dados esses sumarizados na tabela 37.

TABELA 37 – RESUMO DOS SANGUES POR BIOCHIP

Amostras	Quantidade	Porcentagem
Total	76	100%
Negativas	13	17,1%
Positivas para:		
Metanfetamina	17	22,3%
Barbitúricos	8	10,5%
Benzodiazepínicos	18	23,7%
Metadona	1	1,3%
Opióides	1	1,3%
Fenciclidina	0	0%
Cocaína	32	42,1%
THC	10	13,2%
Anfetamina	10	13,2%
Mais de uma substância	28	36,8%

FONTE: O autor (2013)

Analisando a tabela 37, destaca-se que a maioria dos sangues analisados por biochip resultaram positivos para cocaína, sendo 42,1% das amostras. A segunda substância, ou classe de substância, mais presente nas amostras de sangue foi benzodiazepínicos, presente em 23,7% dos sangues.

Para a análise de sangue pelo biochip, ao contrário da análise de urina, as amostras negativas não tiveram tanta expressão, perfazendo 17,1% das amostras.

Ao analisar o disposto na tabela 33, verifica-se que também foram analisadas as 76 amostras de sangue pela técnica cromatográfica.

Nesta técnica, 30 amostras resultaram negativas para as substâncias de interesse.

É possível extrair que não houve amostra positiva para metanfetamina e fenciclidina. Em relação ao THC, o mesmo discutido anteriormente aplica-se a esse caso.

Das amostras positivas para alguma substância, os resultados apontam para oito amostras positivas para barbitúricos, onze para benzodiazepínicos, uma para metadona, uma para opióides, vinte e sete para cocaína e três para anfetamina.

Tem-se cinco amostras integrando o grupo de amostras que acusaram resultado positivo para mais de uma substância simultaneamente.

A tabela 38 resume os dados.

TABELA 38 – RESUMO DOS SANGUES POR CLAE-DAD

Amostras	Quantidade	Porcentagem
Total	76	100%
Negativas	30	39,5%
Positivas para:		
Metanfetamina	0	0%
Barbitúricos	8	10,5%
Benzodiazepínicos	11	14,5%
Metadona	1	1,3%
Opióides	1	1,3%
Fenciclidina	0	0%
Cocaína	27	35,5%
THC	*	*
Anfetamina	3	3,9%
Mais de uma substância	5	6,6%

FONTE: O autor (2013)

NOTA: * - não pode ser avaliado

Ao analisar a tabela 38, depreende-se que a maioria dos sangues analisados pela cromatografia resultaram negativos para as substâncias de interesse, totalizando 39,5% das amostras, padrão esse semelhante ao ocorrido nas análises das amostras de urina.

Das amostras de sangue com resultado positivo, a substância mais presente foi a cocaína, em 35,5% das amostras, seguida pelos benzodiazepínicos, presente em 14,5% das amostras positivas.

Sob um enfoque qualitativo, os resultados apresentados pela técnica de biochip e pela CLAE-DAD neste momento discordam em seus resultados majoritários.

É bem verdade que, das amostras positivas, tanto o biochip quanto a CLAE-DAD concordam em apontar que a cocaína é a principal substância encontrada nas amostras de sangue. Porém há que se considerar outros dois eventos: a maioria das amostras na CLAE resultaram negativas, e no biochip não; e a terceira substância mais encontrada no biochip foram as metanfetaminas e não os barbitúricos, como aconteceu na cromatografia.

Uma análise quantitativa é apresentada na tabela 39.

TABELA 39 – COMPARATIVO PARA SANGUE

Amostras	Biochip	CLAE-DAD	Discordância
Negativas	17,1%	39,5%	22,4%
Positivas para:			
Metanfetamina	22,3%	0%	22,3%
Barbitúricos	10,5%	10,5%	0%
Benzodiazepínicos	23,7%	14,5%	9,2%
Metadona	1,3%	1,3%	0%
Opióides	1,3%	1,3%	0%
Fenciclidina	0%	0%	0%
Cocaína	42,1%	35,5%	6,6%
THC	13,2%	*	13,2%*
Anfetamina	13,2%	3,9%	9,3%

FONTE: O autor (2013)

NOTA: * - não pode ser avaliado

Com os dados dispostos na tabela comparativa, fica possível observar que a maior discordância entre as técnicas, em relação a matriz sanguínea, foi em relação às amostras negativas, resultando em uma diferença de 22,4%.

Novamente, a técnica cromatográfica foi a que obteve o maior índice de amostras negativas, o que, em partes, seria justificado pelo fato de técnicas baseadas em inumoensaio resultarem em índice maior de falso positivo.

Esse fenômeno é agravado em se tratando de sangue total como matriz. O sangue é uma matriz complexa, constituída de inúmeras substâncias químicas que podem atuar como interferentes analíticos, principalmente em inumoensaios

competitivos. Somado a isso, é importante destacar que as amostras forenses são, por vezes, amostras já em estado de putrefação, o que torna essa matriz ainda mais peculiar, pois substâncias novas podem ser adicionadas à matriz provenientes do processo putrefativo.

Essa hipótese do falso positivo no imunoensaio pode ser em parte ilustrada pelos resultados apresentados nas tabelas 37 e 38, no que se refere às amostras que acusaram resultado positivo para mais de uma substância ao mesmo tempo. Pode-se notar que para o biochip, esse evento aconteceu em 28 amostras, ao passo que na cromatografia isso ocorreu em 5 amostras, ou seja, a técnica imunológica tendeu a detectar mais substâncias em uma mesma amostra. Isso fica ainda mais evidente quando comparado com estes resultados para a urina.

Por outro lado, diante de uma discrepância relevante como a encontrada, é provável que nem tudo seja resultado falso positivo proveniente do teste imunológico. Pode-se aventar a hipótese da técnica cromatográfica estar gerando, em algum nível, resultado falso negativo. Tal fato é crítico em se tratando de triagem toxicológica.

Em relação às amostras positivas, a discordância entre as duas técnicas ficou, em média, próximo a 10%, porém houve grande dispersão entre as discordâncias. Observando-se os resultados individualmente, encontra-se situação de discordância relevante, como é o caso da metanfetamina (22,3%).

É necessário destacar que, como ocorreu nas análises de urina, algumas diferenças são mais importantes de serem notadas, principalmente as do tipo “tudo ou nada”, caso da metanfetamina, e diferenças nominais significantes como a anfetamina e, em menor proporção, caso dos benzodiazepínicos.

Observando-se pelo prisma da concordância, os resultados para a matriz sanguínea também apontam para uma boa qualidade analítica de ambas as técnicas para algumas substâncias. É preciso um olhar mais crítico sobre os resultados quando considerados os valores caso a caso.

Reforça-se que, para uma decisão mais acertada de onde encontram-se os resultados equivocados, é necessário o uso da técnica confirmatória e comparação dos resultados entre eles.

5.4.3 Sangue *Versus* Urina

A urina pode ser considerada uma matriz biológica simples, ou seja, de constituição química menos complexa. Tal realidade, aliado ao fato da urina armazenar e concentrar substâncias que por ela serão excretadas do corpo, torna a urina uma das matrizes de escolha nas análises toxicológicas.

A simplicidade dessa matriz geraria resultados analíticos também mais simples, o que pode ser inferido quando analisadas as tabelas de resultados de ambas as técnicas testadas.

O contrário então poderia ser atribuído à matriz sanguínea. Tal matriz é importante para estabelecimento de nexos causais e para quantificações. Por se tratar de uma matriz de elevada complexidade, os resultados analíticos utilizando sangue total como matriz tendem a apresentar maior dispersão e discrepâncias, como pode ser visualizado nas tabelas comparativas do tópico anterior.

É também interessante observar o padrão de positividade entre sangue e urina obtido no estudo, ou seja, a mesma substância de interesse forense, a cocaína, foi de longe a substância mais encontrada em ambas as matrizes.

Essa afirmativa isolada não pode ser extrapolada para um contexto mais geral, uma vez que a amostragem do estudo, como explicitado no início, possui uma tendência proposital de seleção, impedindo assim que esse dado seja refletido no universo total de amostras forenses.

Apesar disso, na prática da toxicologia forense no estado do Paraná, é possível notar que a cocaína é uma substância de interesse forense bastante prevalente. Essa hipótese é fortalecida quando, em nível nacional, vivencia-se um forte movimento de criação e manutenção de políticas públicas voltadas ao enfrentamento do crack na sociedade brasileira.

5.4.4 Análise Confirmatória por CLAE-EM/EM

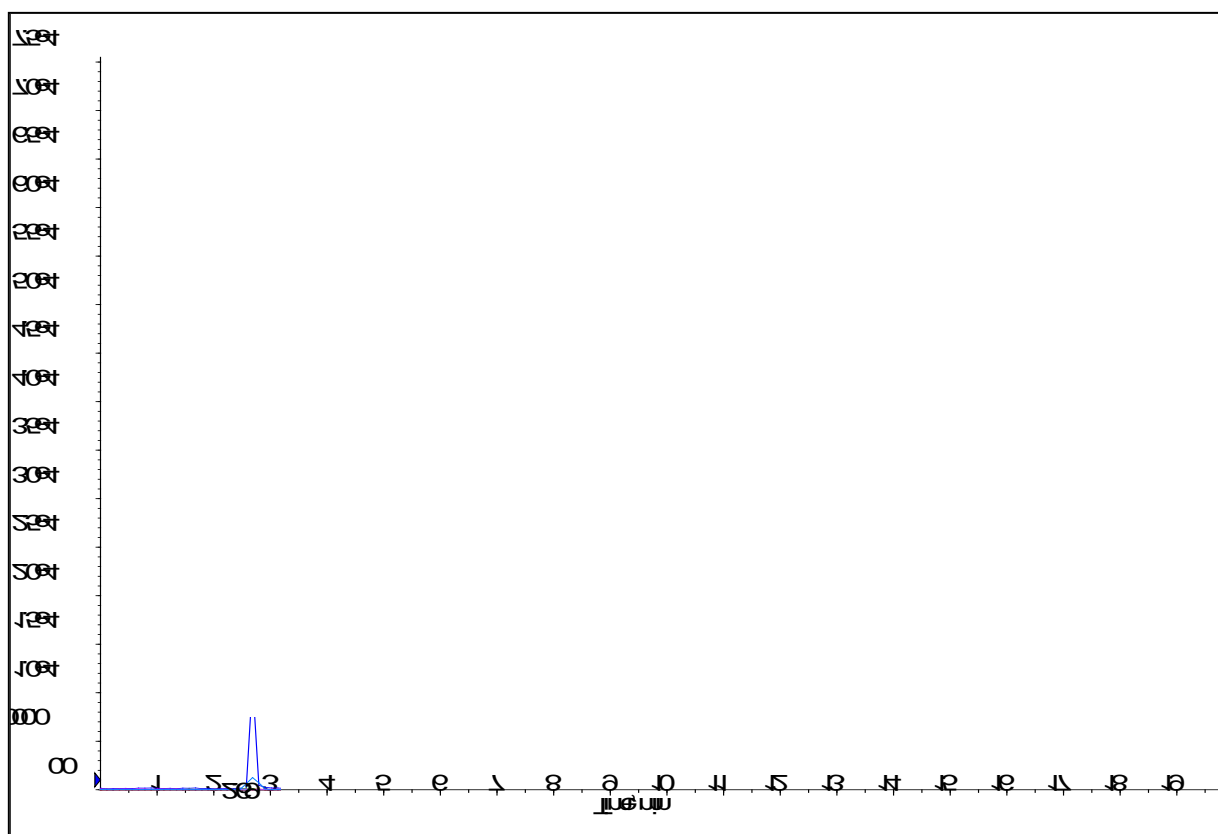
Como já avaliado, as técnicas de triagem testadas apontaram resultados analíticos semelhantes em algumas situações e diferentes, até contraditórios, em outras.

Essas diferenças, discutidas anteriormente em termos de discordância, além de mais prevalentes para alguns grupos de substâncias, também variou em relação

à matriz analítica. Apesar de boa concordância entre as técnicas para algumas substâncias, pode-se perceber uma relevante discordância entre as mesmas técnicas para as análises de outros analitos em particular.

Para um delineamento mais claro sobre a *performance* de cada técnica, ou para verificação do caso de haver uma tendência maior de erro, ou acerto, em algum método aplicado, é necessário comparar os resultados obtidos por cada técnica com os obtidos por uma técnica considerada confirmatória, de referência.

Na figura 25 é possível observar um cromatograma típico obtido pela análise de uma amostra pela técnica de CLAE-EM/EM.



FONTE: O autor (2013)

NOTA: Da esquerda para a direita, pico de anfetamina, cocaína e diazepam.

FIGURA 25 – Cromatograma de amostra obtido por CLAE-EM/EM.

Para efeito de comparação, o resultado obtido pela técnica confirmatória foi considerado como sendo o resultado analítico verdadeiro. Para tabulação e análise dos resultados, os mesmos foram separados por substâncias e matrizes. Além

disso, foi dado foco aos resultados discrepantes entre as técnicas de triagem. Tais dados podem ser observados na tabela 40 e 41.

TABELA 40 – COMPARATIVO ENTRE TRIAGENS E CONFIRMATÓRIO NO SANGUE

Cocaína				Metanfetamina			
Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM	Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM
S14	P	N	N	S3	P	N	N
S16	P	N	N	S12	P	N	N
S18	P	N	N	S16	P	N	P
S20	N	P	N	S17	P	N	P
S23	N	P	P	S36	P	N	N
S24	P	N	N	S38	P	N	N
S69	P	N	N	S42	P	N	N
S72	P	N	N	S47	P	N	N
S73	P	N	P	S48	P	N	N
THC				S51	P	N	P
Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM	S55	P	N	N
S7	P	N	P	S56	P	N	P
S9	P	N	N	S58	P	N	N
S14	P	N	N	S60	P	N	N
S27	P	N	P	S61	P	N	N
S36	P	N	P	S63	P	N	N
S38	P	N	P	S71	P	N	N
S40	P	N	N	Anfetamina			
S50	P	N	N	Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM
S51	P	N	P	S1	P	N	P
S69	P	N	P	S22	P	N	P
Benzodiazepínicos				S28	P	N	P
Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM	S42	P	N	N
S8	P	N	N	S57	P	N	N
S11	P	N	P	S60	P	N	N
S24	P	N	P	S63	P	N	N
S41	P	N	P	Opióides			
S42	P	N	P	Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM
S66	P	N	P	S54	N	P	P
S72	P	N	P	S61	P	N	N

FONTE: O autor (2013)

NOTA: P – positivo; N - negativo

TABELA 41 – COMPARATIVO ENTRE TRIAGENS E CONFIRMATÓRIO NA URINA

Cocaína				Benzodiazepínicos			
Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM	Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM
U9	P	N	N	U2	P	N	P
U11	P	N	N	U10	P	N	P
U15	P	N	N	U72	P	N	N
U23	N	P	N				
U34	P	N	N				
U47	P	N	N				
U76	P	N	N				
THC				Anfetamina			
Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM	Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM
U3	P	N	P	U44	P	N	P
U9	P	N	P	U68	P	N	N
U41	P	N	P				
U60	P	N	P				
U64	P	N	P				
Fenciclidina				Opióides			
Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM	Amostra	Biochip	CLAE-DAD	CLAE-EM/EM
U69	P	N	N	U20	N	P	P
				U69	P	N	P

FONTE: O autor (2013)

NOTA: P – positivo; N - negativo

A análise dos resultados obtidos pela técnica confirmatória permite elucidar as inferências realizadas quando da comparação dos testes de triagem entre si, em relação ao universo de amostras.

Na tabela 40 e 41 estão apresentadas as amostras onde houve discordância de resultados em cada grupo de substâncias em cada técnica de triagem.

Vale destacar que para fenciclidina, barbitúricos e metadona, no sangue, ambas as técnicas concordaram com os resultados em cada amostra e, portanto, essas substâncias não integraram a tabela supracitada.

Para urina, houve concordância das técnicas para metanfetamina, barbitúricos e metadona. Por esse motivo, esses dados também não compõem as tabelas citadas.

A análise dos resultados discrepantes tabulados permite confirmar o já discutido anteriormente, no que se refere a uma relativa prevalência de resultados

falso positivos em técnicas de triagem cujo princípio do método é imunocompetição. Além disso, a etapa crítica dessa técnica de triagem é a lavagem dos biochips que é feita manualmente e suscetível de variação.

Uma outra análise que merece destaque é o apontamento de alguns resultados falso negativos para a técnica cromatográfica, validando as hipótese levantada anteriormente sobre essa ocorrência.

Os índices obtidos podem ser apreciados na tabela 41 e 42.

TABELA 42 – ÍNDICES DE FALSO POSITIVO E NEGATIVO NO SANGUE

Cocaína		Metanfetamina	
Biochip	CLAE-DAD	Biochip	CLAE-DAD
6 FP	1 FP	13 FP	-
1 FN	1 FN	-	4 FN

THC		Opióides	
Biochip	CLAE-DAD	Biochip	CLAE-DAD
4 FP	-	1 FP	-
-	*	1 FN	-

Benzodiazepínicos		Anfetamina	
Biochip	CLAE-DAD	Biochip	CLAE-DAD
1 FP	-	4 FP	-
-	6 FN	-	3 FN

FONTE: O autor (2013)

NOTA: FP – falso positivo; FN – falso negativo

TABELA 43 – ÍNDICES DE FALSO POSITIVO E NEGATIVO NA URINA

Cocaína		Fenciclidina	
Biochip	CLAE-DAD	Biochip	CLAE-DAD
6 FP	1 FP	1 FP	-
-	-	-	-

THC		Opióides	
Biochip	CLAE-DAD	Biochip	CLAE-DAD
-	-	-	-
-	*	1 FN	1 FN

Benzodiazepínicos		Anfetamina	
Biochip	CLAE-DAD	Biochip	CLAE-DAD
1 FP	-	1 FP	-
-	2 FN	-	1 FN

FONTE: O autor (2013)

NOTA: FP – falso positivo; FN – falso negativo

Pode-se observar que os resultados falso positivos foram mais prevalentes na técnica de biochip, apesar de em índices baixos considerando-se o número total de amostras submetidas às técnicas. No sangue, todas as substâncias, ou grupo de substâncias, que acusaram resultados discrepantes entre as técnicas apresentaram resultado falso positivo pela técnica de biochip. O mesmo evento não ocorreu na matriz urinária em dois grupos e apresentou índices mais discretos nessa matriz. Essa diferença entre as matrizes pode ser consequência da diferença de complexidade química de cada matriz.

O primeiro resultado que merece destaque talvez seja o índice de falso positivo para metanfetamina provocado pela técnica imunológica, totalizando treze resultados no sangue.

Uma explicação possível para esse evento seria o fato de que em testes imunocompetitivos, haja reações cruzadas entre substâncias com componentes moleculares semelhantes. Como o sangue total é uma matriz complexa, ou seja, com maior probabilidade de interferentes dispersos na matriz, essas reações cruzadas tenderiam a acontecer com mais frequência nessa matriz. Além disso, as amostras analisadas encontravam-se em variados estágios de putrefação, contendo em sua constituição química um maior número de compostos aminados que poderiam ter sido identificados como semelhantes às metanfetaminas.

Ainda em relação aos falsos positivos, nota-se que a técnica cromatográfica apresentou apenas um resultado falso positivo no sangue e um na urina. Já era esperado um baixo índice de falso positivo nessa técnica devido ao princípio do método analítico que envolve separação e não imunocompetição.

Como apresentado na introdução do estudo, resultados falsos positivos fazem parte da realidade das técnicas de triagem. São resultados bem tolerados, pois todas as amostras que acusarem-se positivas para alguma substância nessa etapa de uma análise toxicológica serão reprocessadas e analisadas em uma técnica com princípio metodológico diferente e/ou parâmetros analíticos mais elaborados. Nessa segunda etapa, chamada confirmatória, aquelas amostras falsamente positivas detectadas na etapa de triagem tendem a resultarem negativas, resolvendo-se a contradição.

Em relação às amostras falsas negativas, o fluxo lógico de uma análise toxicológica é capaz de levantar maiores preocupações. Amostras que acusarem resultado negativo durante a etapa de triagem serão tidas como negativas. Esse é o

paradigma da existência da etapa de triagem: separar o que é negativo do potencialmente positivo para que o potencialmente positivo seja confirmado, e não o negativo. Então resultados falsos negativos na etapa de triagem tendem a não ser confirmados e são tidos como verdadeiros negativos.

Analisando os dados apresentados anteriormente, observa-se três resultados falso negativo para a técnica de biochip dentre as amostras discrepantes entre as triagens. Já em relação à técnica cromatográfica, os resultados falso negativo foram mais relevantes.

Na matriz sanguínea, os índices de falso negativos mais significantes ocorreram no grupo dos benzodiazepínicos e metanfetaminas. Na urina, um padrão semelhante pode ser encontrado. Esse dado diz da dificuldade da técnica cromatográfica em detectar essas substâncias nas amostras analisadas.

Nesse particular, é preciso considerar que vários são os pontos frágeis de um método analítico. Para a descoberta de onde estão ocorrendo erros que estão levando a resultados falsos negativos, deve-ser estudar a fundo e validar todo o método de análise utilizado e frequentemente submetê-lo a testes, controles e otimizações, quando necessárias.

Com a experiência prática obtida nesse estudo, durante a realização dos testes, é possível apontar uma etapa bastante suscetível do teste cromatográfico, que é a etapa de extração.

Nessa etapa há extensa manipulação da amostra e influência simultânea de variáveis. Pode-se dizer que é uma das etapas críticas dessa técnica, provável geradora de erro. Nessa fase pré-analítica, pode estar ocorrendo perdas do analito durante a manipulação e conservação das amostras, bem como uma baixa recuperação durante a execução do método de extração.

Como segundo foco relevante, pode-se dizer da sensibilidade das técnicas utilizadas. Apesar de serem técnicas capazes de detectar analitos em concentrações baixas, normalmente encontradas quando do uso terapêutico ou recreacional das substâncias de interesse, é preciso considerar que técnicas baseadas em quimioluminescência e técnicas que utilizam espectrometria de massas possuem sensibilidade superior às técnicas que utilizam o arranjo de diodos como sistema de detecção. Esse, isoladamente ou associada a outros elementos, pode também ser a origem de alguns dos resultados aqui apresentados.

5.4.5 Vantagens e Desvantagens

Da análise realizada pela técnica de biochip, pode-se citar como vantagem o fato de não haver extensa preparação da amostra, como uma etapa de extração. Também são vantagens o pequeno volume de amostra necessário para a execução teste e o tempo de análise ser curto.

Como desvantagens dessa técnica, pode-se citar que o procedimento analítico é fechado gerando apenas uma gama de análises e resultados possíveis. Além disso, há dependência total dos kits reagentes para o funcionamento do equipamento.

Já em relação à cromatografia, pode-se citar como desvantagem a etapa de preparação ou extração das amostras. Além de consumir um maior número de insumos, tempo e ser por vezes trabalhosa, a extensa manipulação da amostra abre margem para introdução de erros pré-analíticos de difícil solução, como a introdução de contaminantes ou, no oposto, perda do analito.

Apesar de também utilizar um diminuto volume de amostra, é preciso considerar que o tempo total de análise pela técnica de CLAE-DAD é bastante superior ao biochip.

Como vantagem principal da técnica de CLAE-DAD, tem-se o fato do sistema analítico ser aberto, ou seja, ser possível controlar variáveis para um melhor desempenho dos métodos. Sendo assim, as análises e as possibilidades de resultado não ficam necessariamente restritos a uma pequena gama de possibilidades. Isso pode ser bem exemplificado pelas tabelas desse estudo, referente aos resultados da técnica CLAE-DAD. Nelas é possível perceber que algumas amostras apresentaram resultados positivos para outras substâncias químicas que, apesar de não ser de interesse desse estudo, eram de interesse médico-legal, como aldicarb - um agrotóxico carbamato - e alguns antidepressivos e anticonvulsivantes.

Em relação ao custo das técnicas testadas, fica claro que são investimentos diferentes. Para dissertar com maior propriedade sobre cada investimento em tela, seria necessário estudo mais aprofundado e direcionado a esse tema envolvendo o detalhamento de cada constituinte e consumível utilizado nos métodos. Neste trabalho, a análise de custo aventada não pretendeu aprofundar-se a esse nível.

Em relação à diferença de investimentos, pode-se dizer que a técnica de CLAE-DAD demanda um alto investimento a curto prazo.

Para a técnica operar, é necessário que o laboratório tenha estrutura física adequada, com bancadas, ar condicionado, vidraria, setor instrumental próprio dotado de outros equipamentos, dentre outras providências. Além disso, há a necessidade da compra dos equipamentos em si (cromatógrafo, detector, coluna) e também dos consumíveis como *vials*, *inserts*, microseringas, septos, solventes, dentre outros. Tudo isso demanda um alto investimento inicial, pois a técnica não pode ser colocada em funcionamento sem os seus componentes.

Além do investimento inicial, é necessários considerar que haverá, em data futura, gastos com manutenções preventivas, corretivas e reposição de materiais consumíveis. Apesar do alto investimento inicial, esse gasto é diluído pelo elevado número de amostras capazes de serem processadas.

Em relação à técnica de biochip, o investimento poderia ser considerado a médio prazo.

Para o funcionamento dessa técnica, não há a necessidade de alto investimento inicial. A técnica funciona com equipamento único que não demanda muitos cuidados especiais em relação à infraestrutura do laboratório. Além disso, o equipamento não tem custo de aquisição quando em comodato.

O custo da técnica está na aquisição dos kits reagentes. Cada kit contém todos os chips e reagentes necessários para execução do método. Então, para o biochip, não há muito investimento para iniciar o funcionamento da técnica, porém existe um alto investimento para mantê-la operante.

Cada kit reagente, por ser de elevada tecnologia e importado, demanda um gasto considerável. O número de kits necessário varia com a demanda de análise de cada laboratório. Para um laboratório como elevada demanda de análise, o gasto com a aquisição de kits, em um ano, pode chegar a um valor próximo ao preço de compra de um equipamento de CLAE-DAD. Porém, a técnica de biochip não demanda nenhum tipo de manutenção e não exige gastos com consumíveis extras.

Além dos valores envolvendo equipamentos e reagentes, pode-se considerar outro fator impactante no custo: o tempo de análise. O tempo de análise encarece a técnica, de forma indireta, na medida em que um elevado tempo de análise refletiria em uma maior disponibilidade do analista, obtenção de infraestrutura para guarda de amostras até conclusão das análises e uma demora na obtenção do resultado

analítico final. Nesse particular, a técnica cromatográfica demanda um tempo de análise superior ao do biochip.

6 RELEVÂNCIA

6.1 Relevância Científica

As técnicas de triagem toxicológica desenvolveram-se e ganharam campo de atuação na área médica. São frequentes em hospitais e laboratórios clínicos, configurando um exame diagnóstico clínico.

As amostras utilizadas em âmbito forense diferem em muito das matrizes disponíveis em âmbito clínico, tanto na quantidade quanto no tipo e qualidade.

No âmbito forense, o sangue total exerce papel importante. Nessa matriz é que são quantificadas as substâncias de interesse para o caso. Em contra partida, quase não existem técnicas de triagem para o sangue total como matriz. As técnicas existentes focam como matriz ideal a urina, uma matriz importante na área clínica e nem sempre disponível para coleta em casos *postmortem*.

É importante considerar que após a morte acontecem fenômenos cadavéricos de putrefação e contaminações que alteram substancialmente a qualidade da matriz biológica, bem como a natureza química das substâncias imersas nessa matriz. Além disso, as concentrações dos analitos dispersos na matriz podem sofrer alterações em função de contaminação microbiana, degradação e redistribuição pós-morte.

Os testes de triagem, por terem se desenvolvido mais na área clínica, podem não contemplar no princípio do método de análise essas alterações bastante frequentes das matrizes *postmortem* e nas substâncias de interesse forense, refletindo-se em erros analíticos importantes e de consequências igualmente relevantes.

Somado a isso, não há na literatura o estabelecimento de aporte tecnológico mínimo para o funcionamento de um setor forense. Há estabelecimento de parâmetros de qualidade mínima, porém cada serviço de toxicologia forense estabelece por conta qual será seu parque tecnológico e sua rotina analítica.

Estudos, portanto, de técnicas analíticas de triagem que se adequem a uma rotina forense, podem embasar tomadas de decisões científicas mais consistentes no tocante a escolhas de quais técnicas inserir em um serviço de toxicologia forense, que atenda a essa demanda tão peculiar.

Além disso, a evolução na área analítica está bastante ligada a novas combinações de técnicas analíticas já existentes, como cromatografia e espectrometria, dentre outras. Essas combinações geram métodos analíticos diferenciados, com poder analítico consistente e de ampla aplicação prática. Estudos comparativos mais aprofundados entre técnicas de triagem poderiam esclarecer se uma técnica é suficiente de forma isolada ou se é mais vantajosa quando conjugada a outras metodologias.

6.2 Relevância Social

Dados do Ministério da Saúde (2011) sugerem que dos mais de um milhão de óbitos ocorridos no Brasil em 2009, quase cento e trinta e nove mil estão relacionadas a causas externas. Dentro deste grupo encontram-se as circunstâncias mais ligadas ao uso de substâncias químicas como os envenenamentos, autolesões, dentre outros.

Diante desse indicador, apenas, já é possível dimensionar a importância de técnicas analíticas adequadas para a detecção dessas substâncias em matrizes *postmortem* para obtenção de um resultado analítico que embase um laudo pericial consistente e gere dado epidemiológico de qualidade que alimente os bancos de dados em saúde e proporcione gerenciamento social efetivo, papel do Estado.

Tirando o foco do resultado, pensando em todo o processo analítico, é também importante salientar que estudos acerca desses processos técnicos ajudam a esclarecer questões envolvendo custo, celeridade e efetividade do método analítico disponível.

Os institutos de perícia no Brasil fazem parte da administração pública, portanto dotadas de orçamento público vindo dos impostos recolhidos pelos cidadãos. Estudar métodos analíticos objetivando melhorar não só a obtenção de resultados analíticos, mas também a celeridade do processo e o custo *versus* a efetividade é levar em conta a fonte do recurso financeiro estatal e retribuir à sociedade um trabalho eficiente, a um custo aceitável e em tempo razoável

7 CONCLUSÃO

Apesar do estudo não ter se desenvolvido na seara quantitativa, através da utilização de padrões foi possível inferir que as técnicas testadas possuem sensibilidade suficiente para detecção das substâncias de interesse em concentrações na faixa de nanogramas por mililitro. Essa faixa de detecção é suficiente para a análise de amostras forenses reais.

Assim como teorizado, foi possível verificar o impacto do efeito de matriz sobre as técnicas testadas. Nos resultados obtidos, desde a avaliação das técnicas, foi possível observar que o sangue total, por ser uma matriz mais complexa, influenciou o desenvolvimento de ambas as técnicas analíticas. Nesse particular, a urina demonstrou ser a matriz mais fácil de ser analisada por ambas.

Comparando-se as duas técnicas entre si, foi possível observar que para a matriz urina as técnicas atingiram boa concordância e apontaram para uma predominância de amostras negativas. Das positivas, a cocaína foi a substância mais encontrada nessa matriz. Já no sangue total, as técnicas, quando comparadas entre si, revelaram discordâncias mais significativas refletindo sobre os seus resultados majoritários.

Além das divergências encontradas em uma perspectiva mais geral, percebeu-se discordâncias importantes nas análises de algumas substâncias ou grupo de substâncias.

Quando submetidas à análise confirmatória, essas diferenças ficaram mais elucidadas e verificou-se uma prevalência de resultados falso positivo na técnica imunológica, principalmente na detecção de metanfetamina e cocaína. Já na técnica cromatográfica, verificou-se a presença de resultados falso negativo, principalmente para os benzodiazepínicos e compostos aminados. Por se tratar de uma etapa de triagem, recai uma maior preocupação sobre os resultados falso negativo, necessitando a técnica executada de CLAE-DAD uma validação, otimização e compreensão de seus limites.

Em relação às vantagens e desvantagens aventadas, tem-se que, para a técnica de biochip, as principais vantagens consistem na boa performance analítica e no reduzido tempo de análise. Já para técnica cromatográfica, como principais vantagens tem-se a possibilidade de execução de métodos diferentes e a detecção de uma maior gama de substâncias de interesse forense.

REFERÊNCIAS

AMUNDSEN, I, ØIESTAD, Å .M.L.; EKEBERG, D.; KRISTOFFERSEN, L. Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, In Press, Corrected Proof, Available online 15 January 2013.

BAILEY, D. N. Comprehensive toxicology screening in patients admitted to a university trauma Center. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 10, p. 147-149, 1986.

BAILEY, D. N. Results of limited versus comprehensive toxicology screening in a university medical center. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 105, p. 572-575, 1996.

BRANCH, S. Forensic and Clinical Toxicology. In: HODGSON, E. A Textbook of Modern Toxicology. 3 ed. New Jersey: Wiley & Sons, 2004.

BROECKER, S.; HERRE, S.; PRAGST, F. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS). **Forensic Science International**, v. 218, p. 68–81, 2012.

CARMEN SAMPEDRO, M.C.; UNCETA, N.; GOMEZ-CABALLERO, A., CALLADO, L.F.; MORENTIN, B.; GOICOLEA, M.A.; MEANA, J.J.; BARRIO, R.J. A Screening and quantification of antipsychotic drugs in human brain tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to postmortem diagnostics of forensic interest. **Forensic Science International**, v. 219, p. 172–178, 2012.

CHASIN, A. A. M. Parâmetros de confiança analítica e irrefutabilidade do laudo pericial em toxicologia forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 14, n. 1, p. 40-46, 2001.

CHEN, J. S.; CHANG, K. J.; CHARNG, R. C.; LAI, S. J.; BINDER, S. R.; ESSIEN, H. The development of a broad-spectrum toxicology screening program in Taiwan. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**, v. 33, p. 581-589, 1995.

DRESEN, S.; FERREIROS, N.; GNANN, H.; ZIMMERMANN, R.; WEINMANN, W. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2425-2434, 2010.

DRUID, H.; HOLMGREN, P. Compilation of therapeutic, toxic, and fatal concentration of drugs. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 36, p. 133-134, 1998.

DRUMMER, O. H. Postmortem toxicology of drugs of abuse. **Forensic Science International**, v. 142, p. 101-113, 2004.

DRUMMER, O. H. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 388, n. 7, p. 1495-14503, 2007.

DRUMMER, O.H.; GEROSTAMOULOS, J. Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, p. 199-209, 2002.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. Principles of Toxicology. In: KLAASEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6 ed. New York: McGraw Hill, 2001.

FAVRETTO, D., PASCALI, J.P.; TAGLIARO, F. New challenges and innovation in forensic toxicology. Focus on the "New Psychoactive Substances". **Journal of Chromatography A**, In Press, Corrected Proof, Available online 29 December 2012.

FLANAGAM, R. J. Developing an analytical toxicology service. Principles and guidance. **Toxicological Reviews**, v. 23, n. 4, p. 251-263, 2004.

FLANAGAN, R. J.; TAYLOR, A.; WATSON, I. D.; WHELPTON, R. Fundamentals of Analytical Toxicology. 1 ed. England: Wiley & Sons, 2007.

FROST, J.; SLØRDAL, L.; VEGE, A.; NORDRUM, I. S. Forensic autopsies in a naturalistic setting in Norway: Autopsy rates and toxicological findings. **Forensic Science International**. v. 223, p. 353-358, 2012.

GALLO, M. A. History and scope of Toxicology. In: KLAASEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6 ed. New York: McGraw Hill, 2001.

HODGSON, E. Introduction to Toxicology. In: _____. A Textbook of Modern Toxicology. 3 ed. New Jersey: Wiley & Sons, 2004.

LANGMAN, L. J.; KAPUR, B. M. Toxicology: Then and now. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 498 - 510, 2006.

LEIDY, R. B. Analytical Methods in Toxicology. In: HODGSON, E. A Textbook of Modern Toxicology. 3 ed. New Jersey: Wiley & Sons, 2004.

LEIKIN, J. B; WATSON, W. A. Post-mortem toxicology: what the dead can and cannot tell us. **Journal of Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 47-56, 2003.

LEVINE, B. S.; SMITH, M. L.; FROEDE, R. C. *Postmortem* forensic toxicology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 10, n. 3, p. 571-589, 1990.

LINDEN, R.; FASSINA, V. Análise toxicológica sistemática em toxicologia forense. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 16, n. 1, p. 35-48, 2003.

MADEA, B; MUSSHOFF, F. Postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, p. 71-73, 2004.

MAURER, H. H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. **Journal of Chromatography B**, v. 733, p. 3-25, 1999.

MINISTERIO DA SAUDE. Sistema de Informação de Mortalidade. Óbitos por região segundo causa – 2009. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em 01 de novembro de 2011.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Introdução à Toxicologia. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OSSELTON, M. D. Analytical forensic toxicology. **Archives of Toxicology**, Supplement, v. 15, p. 259-267, 1992.

PELISSIER-ALICOT, A. L; GAULIER, J. M; CHAMPSAUR, P; MARQUET, P. Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: a review. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 27, p. 533-544, 2003.

POKLIS, A. Analytic/Forensic Toxicology. In: KLAASEN, C. D. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6 ed. New York: McGraw Hill, 2001.

PRAGST, F.; HERZLER, M.; ERXLEBEN, B. T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1325-1340, 2005.

SKOOP, G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, p. 75-100, 2004.

VERPLAETSE, R.; TYTGAT, J. Development and validation of a sensitive UPLC–MS/MS method for the analysis of narcotic analgesics in urine and whole blood in forensic context. **Forensic Science International**, v. 215, P. 136–145, 2012.

VERSACE, F.; SPORKERT, F.; MANGIN, P.; STAUB, C. Rapid sample pre-treatment prior to GC–MS and GC–MS/MS urinary toxicological screening. **Talanta**, v. 101, p. 299–306, 2012.

VIETTE, V.; GUILLARME, D.; MYLONAS, R.; MAURON, Y.; FATHI, M. RUDAZ, S.; HOCHSTRASSER, D., VEUTHEY, J.-L. A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography–hybrid tandem mass spectrometry (Part I). **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 32–44, 2011.

WINEK, C. L.; WAHBA, W. W.; WINEK JR, C. L.; BALZER, T. W. Drug and chemical blood-level data 2001. **Forensic Science International**, v. 122, p. 107-123, 2001.